

I N Ż Y N I E R I A **BIOMATERIAŁÓW**

ENGINEERING OF BIOMATERIALS
CZASOPISMO POLSKIEGO STOWARZYSZENIA BIOMATERIAŁÓW

Numer 47–53
Rok VIII
ISSN 1429-7248
ISBN 83-89541-51-3

**PAŹDZIERNIK-
GRUDZIEŃ 2005**

WYDAWCA:

Polskie
Stowarzyszenie
Biomateriałów
w Krakowie

KOMITET REDAKCYJNY:

Redaktor naczelny
Stanisław Błażewicz

Sekretarz redakcji,
Skład komputerowy
Augustyn Powroźnik

RADA NAUKOWA:

**Jan Ryszard
Dąbrowski**

Jan Chłopek

Tadeusz Cieślík

**Monika Gierzyńska-
Dolna**

Andrzej Górecki

Wojciech Maria Kuś

Jan Marciniak

Stanisław Mazurkiewicz

Stanisław Mitura

Roman Pampuch

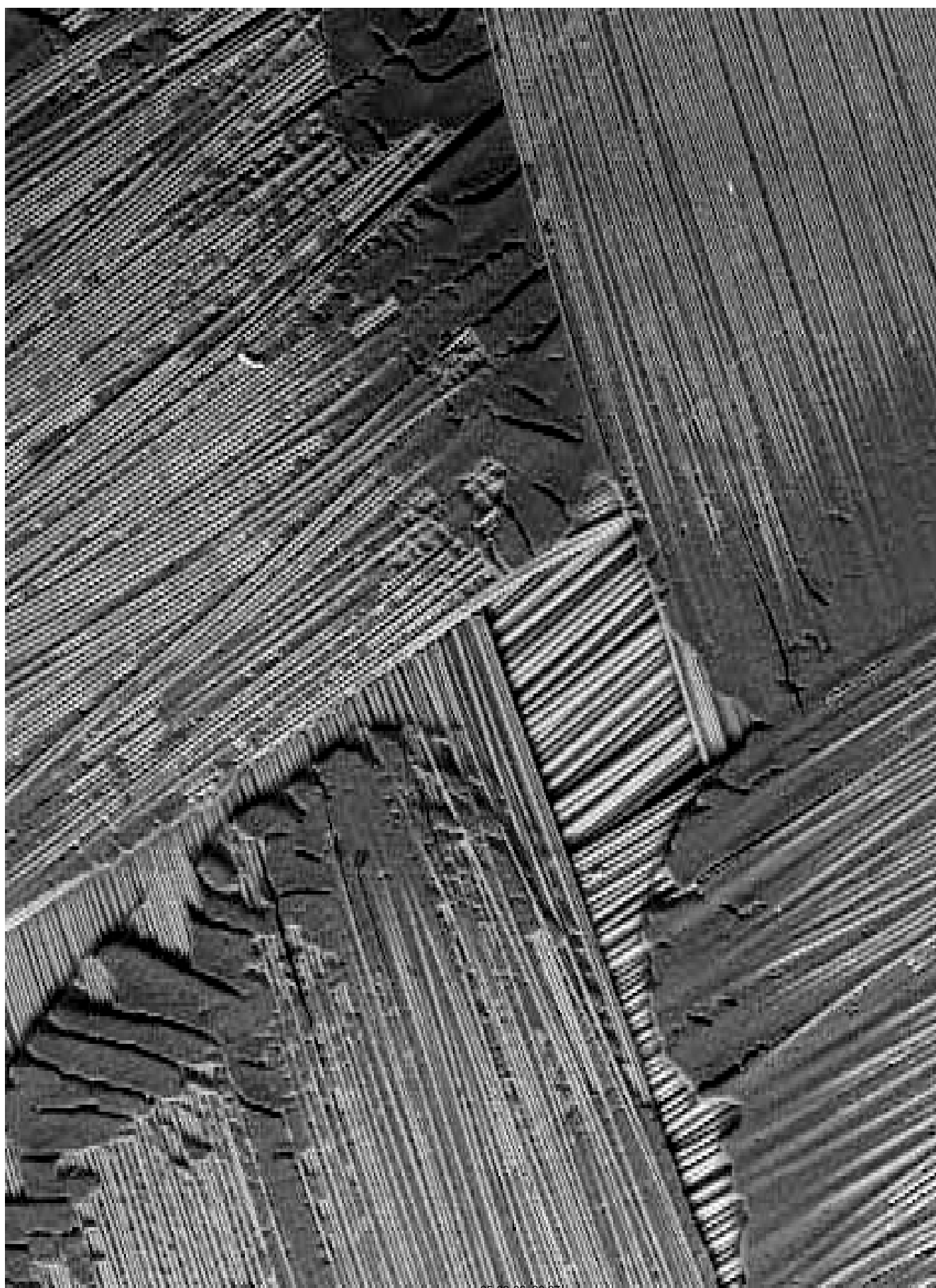
**Bogna Pogorzelska-
Stronczak**

ADRES REDAKCJI:

Akademia
Górnictwo-Hutnicza
al. Mickiewicza 30/A-3
30-059 Kraków

Nakład: 200 egz.

Wydawnictwo Naukowe
AKAPIT
e-mail: wn@akapit.krakow.pl



SPIS TREŚCI

THE ROLE OF BIOMATERIAL RESEARCH IN THE FIELD OF REGENERATIVE MEDICINE C.J. KIRKPATRICK	1
BIORESORBABLE HYDROGELS PREPARED FROM POLYLACTIDE/POLY(ETHYLENE GLYCOL) BLOCK COPOLYMERS S. LI	2
ADHESION OF BONE AND VASCULAR CELLS ON CARBON FIBRE-REINFORCED CARBON COMPOSITES COATED WITH A FULLERENE LAYER L. BACAKOVA, L. GRAUSOVA, J. VACIK, I. JUNGOVA	3
HUMAN OSTEOBLAST-LIKE CELLS MG 63 IN CULTURES ON POLYMER-CARBON-ALGINATE COMPOSITES L. GRAUSOVA, L. BACAKOVA, E. STODOLAK, S. BLAZEWICZ, T. MIKOŁAJCZYK	6
ADHESION AND GROWTH OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS ON PROTEIN ASSEMBLIES FOR BIOMATERIAL COATING E. FILOVÁ, E. BRYNDA, M. HOUSKA, T. RIEDEL, L. BAČÁKOVÁ	9
EXTRA-CELLULAR MATRICES FOR TITANIUM IMPLANTS T. DOUGLAS, U. HEMPEL, S. BIERBAUM, D. SCHARNWEBER, H. WORCH	12
METHOD OF MODEL FORMATION OF TRAUMATIC OSTEOMYELITIS OF MANDIBLE IN EXPERIMENT A.Z. BARMUTSKAYA, I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA	13
CARIES DISEASES PREVENTION BY LASER ACUPUNCTURE NEEDLE I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA	14
STUDY OF THE PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF BIOMATERIAL COMPOSITES USED IN MIXED CROWNS A. POPOVICI, D. BORZEA, A. POP, A. ROMAN, O. PASTRAV, M. MOLDOVAN, C. PREJMEREAN	15
BIOMATERIALS BASED ON POLYSILOXANES AND GLASS FIBERS T. SUCHY, K. BALIK, M. SOCHOR, M. CERNY, R. SEDLACEK, V. PESAKOVA, H. HULEJOVA	16
METHOD MODIFICATION FOR STUDYING OF ORAL FLUID MICRO-CRYSTALLIZATION FOR PATIENTS WITH PURULENT-INFLAMMATORY DISEASES IN CRANIO-MAXILLOFACIAL AREA I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, Y.M. KAZAKOVA	18

*Streszczone w Applied Mechanics Reviews
Abstracted in Applied Mechanics Reviews*

CONTENT

THE ROLE OF BIOMATERIAL RESEARCH IN THE FIELD OF REGENERATIVE MEDICINE C.J. KIRKPATRICK	1
OPBIORESORBABLE HYDROGELS PREPARED FROM POLYLACTIDE/POLY(ETHYLENE GLYCOL) BLOCK COPOLYMERS S. LI	2
ADHESION OF BONE AND VASCULAR CELLS ON CARBON FIBRE-REINFORCED CARBON COMPOSITES COATED WITH A FULLERENE LAYER L. BACAKOVA, L. GRAUSOVA, J. VACIK, I. JUNGOVA	3
HUMAN OSTEOBLAST-LIKE CELLS MG 63 IN CULTURES ON POLYMER-CARBON-ALGINATE COMPOSITES L. GRAUSOVA, L. BACAKOVA, E. STODOLAK, S. BLAZEWICZ, T. MIKOŁAJCZYK	6
ADHESION AND GROWTH OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS ON PROTEIN ASSEMBLIES FOR BIOMATERIAL COATING E. FILOVÁ, E. BRYNDA, M. HOUSKA, T. RIEDEL, L. BAČÁKOVÁ	9
EXTRA-CELLULAR MATRICES FOR TITANIUM IMPLANTS T. DOUGLAS, U. HEMPEL, S. BIERBAUM, D. SCHARNWEBER, H. WORCH	12
METHOD OF MODEL FORMATION OF TRAUMATIC OSTEOMYELITIS OF MANDIBLE IN EXPERIMENT A.Z. BARMUTSKAYA, I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA	13
CARIES DISEASES PREVENTION BY LASER ACUPUNCTURE NEEDLE I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA	14
STUDY OF THE PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF BIOMATERIAL COMPOSITES USED IN MIXED CROWNS A. POPOVICI, D. BORZEA, A. POP, A. ROMAN, O. PASTRAV, M. MOLDOVAN, C. PREJMEREAN	15
BIOMATERIALS BASED ON POLYSILOXANES AND GLASS FIBERS T. SUCHY, K. BALIK, M. SOCHOR, M. CERNY, R. SEDLACEK, V. PESAKOVA, H. HULEJOVA	16
METHOD MODIFICATION FOR STUDYING OF ORAL FLUID MICRO-CRYSTALLIZATION FOR PATIENTS WITH PURULENT-INFLAMMATORY DISEASES IN CRANIO-MAXILLOFACIAL AREA I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, Y.M. KAZAKOVA	18

*Wydanie dofinansowane przez Ministra Nauki i Informatyzacji
Edition financed by the Minister of Science and Information
Society Technologies*

DEVELOPMENT OF NEW DESIGN OF THE ACETABULAR COMPONENT FOR TOTAL HIP REPLACEMENT J. SYKORA, S. KONVICKOVA, M. DANIEL	19
FINITE ELEMENT ANALYSIS OF HUMAN HIP JOINT J. VRANA, Z. HORAK, J. MICHALEC	21
FINITE ELEMENT ANALYSES OF MODULAR KNEE JOINT REPLACEMENT L. ZACH, S. KONVICKOVA, P. RUZICKA	22
MORFOLOGICAL RESULTS OF ACUPUNCTURE STIMULATION FOR SKIN WOUNDS REPARATION IN EXPERIMENT I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, A.V. ZIVENKA	23
STUDY OF THE REPARATIVE OSTEOINTEGRATION PROPERTIES OF CALCIUM PHOSPHATE CERAMICS "KAFAM" T.M. ULYANOVA, L.V. TITOVA, V.L. EVTUKHOV, L.G. BYKADOROVA, Y.D. KOVALENKO	24
COPOLYMERS OF L-LACTIDE AND TRIMETHYLENE CARBONATE EVALUATION OF SURFACE PROPERTIES AND DEGRADATION IN AQUEOUS MEDIUM E. PAMUŁA, E. GAUGAIN, A. DESSART, P. DOBRZYŃSKI	25
WPŁYW SKŁADU CHEMICZNEGO I PARAMETRÓW SPIEKANIA NA WŁAŚCIWOŚCI TWORZYW KALCYTOWYCH S. MICHAŁOWSKI, Z. JAEGERMANN, J. KARAŚ	28
WPŁYW JONÓW GLINU NA STRUKTURĘ TKANKI OSIERDZIA ŚWINI, BADANEJ Z UŻYCIEM EPR-METODY ZNACZNIKÓW SPINOWYCH B. C WALINA, L. DUL, M. JASTRZĘBSKA	31
IMMOBILIZACJA GENTAMYCYN NA NOŚNIKACH HYDROKSYAPATYTOWYCH W CELU NADANIA IM WŁASNOŚCI ANTYBAKTERYJNYCH A. BELCARZ, J. ZALEWSKA, G. GINALSKA, A. ŚLÓSARCZYK	34
NOWE NANOPOLIMERY-ZASTOSOWANIE JAKO NOŚNIKI LEKÓW W MEDYCYNIE Z. JEDLIŃSKI	37
MODYFIKACJA IBUPROFENU NANOPOLIMEREM KWASU 3-HYDROKSYMASŁOWEGO Z. JEDLIŃSKI, I. BOSEK, M. JUZWA, A. RUSIN	38
STRUKTURA KOMPOZYTÓW NA BAZIE STALI IMPLANTACYJNEJ 316L Z DODATKIEM PIROFOSFORANU WAPNIA M. GRĄDZKA-DAHLKE, J.R. DĄBROWSKI, B. DĄBROWSKI	39
CHARAKTERYSTYKA SPIEKÓW POROWATYCH ZE STALI 316L NA PANEWKI ENDOPROTEZ STAWOW M. GRĄDZKA-DAHLKE, J.R. DĄBROWSKI	43

DEVELOPMENT OF NEW DESIGN OF THE ACETABULAR COMPONENT FOR TOTAL HIP REPLACEMENT J. SYKORA, S. KONVICKOVA, M. DANIEL	19
FINITE ELEMENT ANALYSIS OF HUMAN HIP JOINT J. VRANA, Z. HORAK, J. MICHALEC	21
FINITE ELEMENT ANALYSES OF MODULAR KNEE JOINT REPLACEMENT L. ZACH, S. KONVICKOVA, P. RUZICKA	22
MORFOLOGICAL RESULTS OF ACUPUNCTURE STIMULATION FOR SKIN WOUNDS REPARATION IN EXPERIMENT I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, A.V. ZIVENKA	23
STUDY OF THE REPARATIVE OSTEOINTEGRATION PROPERTIES OF CALCIUM PHOSPHATE CERAMICS "KAFAM" T.M. ULYANOVA, L.V. TITOVA, V.L. EVTUKHOV, L.G. BYKADOROVA, Y.D. KOVALENKO	24
COPOLYMERS OF L-LACTIDE AND TRIMETHYLENE CARBONATE EVALUATION OF SURFACE PROPERTIES AND DEGRADATION IN AQUEOUS MEDIUM E. PAMUŁA, E. GAUGAIN, A. DESSART, P. DOBRZYŃSKI	25
THE INFLUENCE OF CHEMICAL COMPOSITIONS AND SINTERING PARAMETERS ON THE PROPERTIES OF CALCITE MATERIALS S. MICHAŁOWSKI, Z. JAEGERMANN, J. KARAŚ	28
THE INFLUENCE OF ALUMINIUM IONS ON THE PORCINE PERICARDIUM TISSUE STRUCTURE INVESTIGATED BY EPR-SPIN LABELING METHOD B. C WALINA, L. DUL, M. JASTRZĘBSKA	31
GENTAMICIN IMMOBILIZATION ON HYDROXYAPATITE CARRIERS FOR INCREASING THEIR ANTIBACTERIAL PROPERTIES A. BELCARZ, J. ZALEWSKA, G. GINALSKA, A. ŚLÓSARCZYK	34
NOVEL NANOPOLYMERS - USEFUL DRUG CARRIERS FOR MEDICAL APPLICATIONS Z. JEDLIŃSKI	37
MODIFICATION OF IBUPROFEN USING NANOPOLYMERS OF 3-HYDROXYBUTYRIC ACID Z. JEDLIŃSKI, I. BOSEK, M. JUZWA, A. RUSIN	38
THE ESTIMATION OF THE PROPERTIES OF IMPLANT Co-Cr-Mo-ALLOY BASED COMPOSITES M. GRĄDZKA-DAHLKE, J.R. DĄBROWSKI, B. DĄBROWSKI	39
THE CHARACTERISTICS OF POROUS SINTERED COMPACTS OF 316L STEEL FOR BEARINGS OF HIP JOINT ENDOPROSTHESES M. GRĄDZKA-DAHLKE, J.R. DĄBROWSKI	43

WPŁYW WYBRANYCH MODYFIKACJI NA WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNI TYTANU	46
M. LEWANDOWSKA, H. GARBACZ, B. POLAK, W. FABIANOWSKI, J. KAMIŃSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ	
HYDROLITYCZNA I ENZYMATYCZNA DEGRADACJA KOPOLIMERU GLIKOLIDU Z L-LAKTYDEM	49
E. PAMUŁA, M.M. RUTKOWSKA	
PREPARATYKA WARSTW KOMPOZYTOWYCH HYDROKSYAPATYT-ŻELATYNA METODĄ ZOL-ŻEL	53
A. STOCH, E. DŁUGOŃ, W. JASTRZĘBSKI, A. ADAMCZYK	
BADANIA POWŁOK FOSFORANOWO-KRZEMIANOWYCH NA PODŁOŻU METALICZNYM METODĄ SPEKTROSKOPII W PODCZERWIENI ORAZ METODAMI RENTGENOWSKIMI	54
M. ROKITA, M. HANDKE, A. BROŻEK, A. ADAMCZYK, W. JASTRZĘBSKI	
BADANIA RENTGENOGRAFICZNE ŻELI I POWŁOK KRZEMIANOWYCH I KRZEMIANOWO-FOSFORANOWYCH	58
A. ADAMCZYK, M. HANDKE, M. ROKITA, A. BROŻEK	
ODDZIAŁYWANIE NANOPOWŁOK KRZEMIONKOWO-TYTANOWYCH ZE STOPEM DENTYSTYCZNYM REMANIUM 2000	60
A. STOCH, J. STOCH, M. MIKOŁAJCZYK, E. DŁUGOŃ	
WŁÓKNA WĘGLOWE MODYFIKOWANE HYDROKSYAPATYTEM	63
I. PIEKARCZYK-RAJZER, M. BŁAŻEWICZ	
ZAKŁÓCENIA OBRAZU W BADANIACH TOMOGRAFII KOMPUTEROWEJ (TK) I TOMOGRAFII REZONANSU MAGNETYCZNEGO (MR)	65
J. ŚWIĄTKOWSKI, E. JARKIEWICZ-KOCHMAN, E. PACHOLEC, G. BENKE, M. GOŁĘBOWSKI, S. BŁAŻEWICZ, A. WOJCIECHOWSKI	
OCENA ENDOPROTEZ STAWU BIODROWEGO W BADANIU TOMOGRAFII KOMPUTEROWEJ (TK)	67
E. JARKIEWICZ-KOCHMAN, J. ŚWIĄTKOWSKI, M. GOŁĘBOWSKI, E. PACHOLEC, T. JABŁOŃSKI, K. PURSKI	
TRUDNOŚCI W OCENIE BADAŃ TOMOGRAFII KOMPUTEROWEJ (TK) PO ZAŁOŻENIU APARATU ILIZAROWA	68
E. PACHOLEC, J. ŚWIĄTKOWSKI, E. JARKIEWICZ-KOCHMAN, S. ŻAREK, J. MACIAS, M. GOŁĘBOWSKI	
SEGMENTOWY GWÓZDŹ ŚRÓDSZPIKOWY - KONCEPCJA ROZWIĄZANIA	69
R. BĘDZIŃSKI, L.J. JANKOWSKI	
ZAWIERAJĄCE NANODODATEK MONTMORYLONITU PREKURSOWE WŁÓKNA PAN DO ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH	71
M. BOGUŃ, T. MIKOŁAJCZYK	

INFLUENCE OF MODIFICATIONS ON THE PROPERTIES OF TITANIUM SURFACE	46
M. LEWANDOWSKA, H. GARBACZ, B. POLAK, W. FABIANOWSKI, J. KAMIŃSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ	
HYDROLYTIC AND ENZYMATIC DEGRADATION OF POLY(GLYCOLIDE-CO-L-LACTIDE)	49
E. PAMUŁA, M.M. RUTKOWSKA	
SOL-GEL PREPARATION OF HYDROXYAPATITE-GELATIN COMPOSITE LAYERS	53
A. STOCH, E. DŁUGOŃ, W. JASTRZĘBSKI, A. ADAMCZYK	
IR SPECTROSCOPY AND XRD STUDIES OF PHOSPHO-SILICATE LAYERS ON THE METAL BASE	54
M. ROKITA, M. HANDKE, A. BROŻEK, A. ADAMCZYK, W. JASTRZĘBSKI	
THE X-RAY STUDIES OF SILICATE AND PHOSPHOSILICATE GELS AND COATINGS	58
A. ADAMCZYK, M. HANDKE, M. ROKITA, A. BROŻEK	
SILICA-TITANIA NANODEPOSITS INTERACTION WITH DENTAL ALLOY REMANIUM 2000	60
A. STOCH, J. STOCH, M. MIKOŁAJCZYK, E. DŁUGOŃ	
CARBON FIBRES MODIFIED WITH HYDROXYAPATITE	63
I. PIEKARCZYK-RAJZER, M. BŁAŻEWICZ,	
IMAGE INTERFERENCE IN THE COMPUTED TOMOGRAPHY AND THE NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE EXAMINATIONS	65
J. ŚWIĄTKOWSKI, E. JARKIEWICZ-KOCHMAN, E. PACHOLEC, G. BENKE, M. GOŁĘBOWSKI, S. BŁAŻEWICZ, A. WOJCIECHOWSKI	
ASSESSMENT OF THE HIP JOINT ENDOPROTHESIS IN THE COMPUTED TOMOGRAPHY EXAMINATION	67
E. JARKIEWICZ-KOCHMAN, J. ŚWIĄTKOWSKI, M. GOŁĘBOWSKI, E. PACHOLEC, T. JABŁOŃSKI, K. PURSKI	
PATIENTS WITH ILIZAROW APPARATUS - PROBLEMS IN THE COMPUTED TOMOGRAPHY IMAGES INTERPRETATION	68
E. PACHOLEC, J. ŚWIĄTKOWSKI, E. JARKIEWICZ-KOCHMAN, S. ŻAREK, J. MACIAS, M. GOŁĘBOWSKI	
SECTIONAL INTRAMEDULLARY NAIL - CONSTRUCTION IDEA	69
R. BĘDZIŃSKI, L.J. JANKOWSKI	
NANOMONTMORILLONITE-CONTAINING PRECURSOR PAN FIBERS FOR MEDICAL APPLICATION	71
M. BOGUŃ, T. MIKOŁAJCZYK	

RESORBOWALNE WŁÓKNA POLIMEROWE (PGLA) MODYFIKOWANE POWIERZCHNIOWO BIOSZKŁEM 74
B. SZARANIEC, K. CHOLEWA-KOWALSKA, J. CHŁOPEK, S. BŁĄŻEWICZ

BADANIE WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH I HISTOMORFOMETRYCZNYCH TKANKI KOSTNEJ KOŚCI UDOWEJ CZŁOWIEKA 78
R. BĘDZIŃSKI, A. OSTROWSKA, K. ŚCIGAŁA, A. MAZURKIEWICZ

WSTĘPNE BADANIA NAD DEGRADACJĄ WŁÓKNIEN Z KOPOLIMERU GLIKOLIDU Z L-LAKTYDEM: ZMIANY WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH 81
J. BUCZYŃSKA, E. PAMUŁA, S. BŁĄŻEWICZ, T. MIKOŁAJCZYK, A. KURZAK, P. DOBRZYŃSKI

BIOCERAMIKA Z PREKURSORÓW POLIMEROWYCH JAKO SUBSTYTUT TKANKI KOSTNEJ 85
T. GUMUŁA, J. PODPORSKA, M. BŁĄŻEWICZ

WPŁYW DODATKÓW MODYFIKUJĄCYCH NA WŁAŚCIWOŚCI POLI(LAKTYDO-KO-GLIKOLIDU) W WARUNKACH IN VITRO 88
P. ROSÓŁ, J. CHŁOPEK, K. PIELICHOWSKA, J. PIELICHOWSKI, D. MULICA

ZASTOSOWANIE KOMPOZYTÓW CERAMIKA-POLIMER O OSNOWIE Z CERAMICZNEGO TWORZYWA POROWATEGO Z FOSFORANÓW WAPNIOWYCH W INŻYNIERII TKANKOWEJ 92
M. SZAFRAN, E. BOBRYK, R. RZESZUTEK, A. CHRÓŚCICKA, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ

BADANIA ODPORNOŚCI KOROZYJNEJ STOPU Co-Cr-W-Ni Z PRZEZNACZENIEM NA IMPLANTY STOSOWANE W KARDIOLOGII ZABIEGOWEJ 96
W. WALKE, Z. PASZENDA, J. MARCINIAK

KINETYKA UWALNIANIA PENTOKSYFILINY (PTX) I DOKSYCYKLINY (DOX) Z MODYFIKOWANYCH WIELOFUNKCYJNYCH IMPLANTÓW HYDROKSYAPATYTOWYCH 99
A. ZIMA, A. ŚŁOSARCZYK, Z. PASZKIEWICZ

WPŁYW KOPOLIMERU P(LLA/GLA) WZMACNIANEGO WŁÓKNAMI WĘGLOWYMI NA GOJENIE RAN KOSTNYCH ŻUCHWY KRÓLIKÓW 104
M. CIEŚLIK, D. SABAT, A. CIEŚLIK-BIELECKA, M. ADWENT, G. BAJOR, T. CIEŚLIK, M. WYSOCZAŃSKA

IMMOBILIZACJA AMIKACyny NA RÓŻNYCH TYPACH PROTEZ NACZYNIOWYCH 107
M. OSIŃSKA, G. GINALSKA, A. URYNIAK

RADIACYJNA STERYLIZACJA POLI(ε-KAPROLAKTONU) (I) 110
K. FILIPCZAK, M. WOŹNIAK, L. OLAH, P. ULAŃSKI, J.M. ROSIAK, R.M. OLKOWSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ

RADIACYJNA STERYLIZACJA POLI(ε-KAPRO-LAKTONU) (II) 113
K. FILIPCZAK, M. WOŹNIAK, P. ULAŃSKI, J.M. ROSIAK, G. PRZYBYTNIK, R.M. OLKOWSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ

BIOGLASS MODIFIED RESORBABLE POLYMER FIBRES (PGLA) 74
B. SZARANIEC, K. CHOLEWA-KOWALSKA, J. CHŁOPEK, S. BŁĄŻEWICZ

THE INVESTIGATIONS OF MECHANICAL AND HISTOMORPHOMETRIC PROPERTIES OF HUMAN FEMUR CANCELLOUS BONE 78
R. BĘDZIŃSKI, A. OSTROWSKA, K. ŚCIGAŁA, A. MAZURKIEWICZ

PRELIMINARY STUDIES ON HYDROLYTIC DEGRADATION OF POLY(GLYCOLIDE-CO-L-LACTIDE) FIBERS: MECHANICAL PROPERTIES VARIATIONS 81
J. BUCZYŃSKA, E. PAMUŁA, S. BŁĄŻEWICZ, T. MIKOŁAJCZYK, A. KURZAK, P. DOBRZYŃSKI

BIOCERAMICS OBTAINED FROM POLYMER PRECURSORS AS A BONE TISSUE SUBSTITUTE 85
T. GUMUŁA, J. PODPORSKA, M. BŁĄŻEWICZ

THE EFFECT OF MODIFYING PHASES ON PROPERTIES OF POLI(LACTIDO-CO-GLYCOLIDE) AT IN VITRO CONDITIONS 88
P. ROSÓŁ, J. CHŁOPEK, K. PIELICHOWSKA, J. PIELICHOWSKI, D. MULICA

APPLICATION OF POLYMER-CERAMIC COMPOSITES BASED ON A CALCIUM PHOSPHATE POROUS CERAMIC MATERIAL IN TISSUE ENGINEERING 92
M. SZAFRAN, E. BOBRYK, R. RZESZUTEK, A. CHRÓŚCICKA, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ

CORROSION RESISTANCE OF Co-Cr-W-Ni ALLOY DESIGNED FOR IMPLANTS USED IN OPERATIVE CARDIOLOGY 96
W. WALKE, Z. PASZENDA, J. MARCINIAK

KINETICS OF PENTOXIFYLLINE (PTX) AND DOXYCYCLINE (DOX) RELEASE FROM MODIFIED MULTIFUNCTIONAL HYDROXYAPATITE IMPLANTS 99
A. ZIMA, A. ŚŁOSARCZYK, Z. PASZKIEWICZ

INFLUENCE OF LACTIDE-GLYCOLIDE COPOLYMER REINFORCED BY CARBON FIBERS ON RABBITS MANDIBLE OSSEOUS WOUNDS HEALING 104
M. CIEŚLIK, D. SABAT, A. CIEŚLIK-BIELECKA, M. ADWENT, G. BAJOR, T. CIEŚLIK, M. WYSOCZAŃSKA

IMMOBILIZATION OF AMIKACIN TO SEVERAL VASCULAR PROSTHESES FROM DIFFERENT SOURCES 107
M. OSIŃSKA, G. GINALSKA, A. URYNIAK

RADIATION STERILIZATION OF POLY(ε-CAPROLACTONE) (I) 110
K. FILIPCZAK, M. WOŹNIAK, L. OLAH, P. ULAŃSKI, J.M. ROSIAK, R.M. OLKOWSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ

RADIATION STERILIZATION OF POLY(ε-CAPRO-LACTONE) (II) 113
K. FILIPCZAK, M. WOŹNIAK, P. ULAŃSKI, J.M. ROSIAK, G. PRZYBYTNIK, R.M. OLKOWSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ

BADANIA LUDZKICH KAMIENI ŻÓŁCIOWYCH PRZY UŻYCIU MIKROSKOPU SIŁ ATOMOWYCH - OSIĄGNIĘCIA I TRUDNOŚCI	116
I. MRÓZ, B. BARWIŃSKI, K. MATYKA, A. CISZEWSKI	

OSADZANIE CIENKICH WARSTW Z HYDROKSY- APATYTU METODĄ LASEROWEJ ABLACJI	117
W. MRÓZ, B. MAJOR, R. MAJOR, A. PROKOPIUK, T. WIERZCHOŃ	

ANALIZA SZTYWNOŚCI KOMPOZYTOWEGO STABILIZATORA KOŚCI DŁUGICH	120
J. FILIPIAK, R. BĘDZIŃSKI, J. CHŁOPEK	

WPŁYW RODZAJU TLENKU GLINU NA WŁAŚCIWOŚCI TWORZYW KORUNDOWYCH NA NOŚNIKI KOMÓREK	122
Z. JAEGERMANN, S. MICHAŁOWSKI, J. KARAŚ	

WPŁYW MODYFIKACJI POWIERZCHNI NA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE SIATECZEK TYTANOWYCH	124
H. GARBACZ, M. LEWANDOWSKA	

IMPEDANCYJNA CHARAKTERYSTYKA ANODOWANEGO TYTANU W BADANIACH IN VITRO	128
I. GŁAZOWSKA, E. KRASICKA-CYDZIK	

MIKROSKOPOWE BADANIA ANODOWYCH WARSTW NA IMPLANTACH TYTANOWYCH STOPÓW ZANURZONYCH W ROZTWORZE SBF	130
E. KRASICKA-CYDZIK, I. GŁAZOWSKA, M. MICHAŁSKI	

STRUKTURA I ODPORNOŚĆ KOROZYJNA AZOTOWANEJ POWIERZCHNI STOPU NiTi DLA ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH	133
J. LELĄTKO, P. PĄCZKOWSKI, T. GORYCZKA, T. WIERZCHOŃ, Z. PASZENDA, H. MORAWIEC	

CHARAKTERYSTYKI TRIBOLOGICZNE POLIETYLENU UHMWPE STOSOWANEGO NA WKŁADKI ENDOPROTEZ STAWU KOLANOWEGO	136
M. JAŁBRZYKOWSKI, A. IWANIAK, J.R. DĄBROWSKI, P. WOJCIECHOWSKI, D. KUSZ	

ANALIZA BIOMECHANICZNA STENTÓW UROLOGICZNYCH	141
W. KAJZER, J. MARCINIAK	

KOPOLIMERY GLIKOLIDU Z TMC, METODA WYZNACZANIA MIKROSTRUKTURY ŁAŃCUCHA Z POMOCĄ SPEKTROSKOPII NMR	143
J. KASPERCZYK, P. DOBRZYŃSKI, M. BERO	

CHARAKTERYSTYKA WARSTWY WIERZCHNIEJ STOPU Ti6Al4V PO ODKSZTAŁCENIU PRZEZ GIĘCIE	146
A. KIERZKOWSKA, E. KRASICKA-CYDZIK, M. JENEK	

WPŁYW DZIAŁANIA PLAZMY H ₂ O ₂ NA WŁAŚCIWOŚCI FILMÓW POLISULFONOWYCH	148
J. KOWAL, B. CZAJKOWSKA, S. MURATÓW-BODUCH, A. ORGANISCIK, B. TRYBALSKA	

LAFM INVESTIGATIONS OF HUMAN GALLSTONES - ACHIEVEMENTS AND DIFFICULTIES	116
I. MRÓZ, B. BARWIŃSKI, K. MATYKA, A. CISZEWSKI	

DEPOSITION OF HYDROXYAPATITE THIN FILMS USING LASER ABLATION METHOD	117
W. MRÓZ, B. MAJOR, R. MAJOR, A. PROKOPIUK, T. WIERZCHOŃ	

MECHANICAL PROPERTIES OF LONG BONE COMPOSITE EXTERNAL FIXATOR	120
J. FILIPIAK, R. BĘDZIŃSKI, J. CHŁOPEK	

THE INFLUENCE OF THE TYPE OF Al ₂ O ₃ POWDER ON THE PROPERTIES OF SINTERED ALUMINA	122
Z. JAEGERMANN, S. MICHAŁOWSKI, J. KARAŚ	

INFLUENCE OF SURFACE MODIFICATIONS ON MECHANICAL PROPERTIES OF TITANIUM MESHES	124
H. GARBACZ, M. LEWANDOWSKA	

IMPEDANCE CHARACTERISTICS OF ANODIZED TITANIUM IN VITRO	128
I. GŁAZOWSKA, E. KRASICKA-CYDZIK	

MICROSCOPIC STUDIES OF ANODIC LAYERS ON TITANIUM IMPLANT ALLOYS IMMERSSED IN SBF SOLUTION	130
E. KRASICKA-CYDZIK, I. GŁAZOWSKA, M. MICHAŁSKI	

SURFACE STRUCTURE AND CORROSION RESISTIVITY OF THE NITRIDED NiTi ALLOYS FOR MEDICAL APPLICATIONS	133
J. LELĄTKO, P. PĄCZKOWSKI, T. GORYCZKA, T. WIERZCHOŃ, Z. PASZENDA, H. MORAWIEC	

THE TRIBOLOGICAL PROPERTIES OF A POLYETHYLENE UHMWPE OF AN ENDOPROSTHESIS FOR A KNEE JOINT	136
M. JAŁBRZYKOWSKI, A. IWANIAK, J.R. DĄBROWSKI, P. WOJCIECHOWSKI, D. KUSZ	

BIOMECHANICAL ANALYSIS OF UROLOGICAL STENTS	141
W. KAJZER, J. MARCINIAK	

GLICOLIDE/TRIMETHYLENE CARBONATE(TMC) COPOLYMERS, CHAIN MICROSTRUCTURE ANALYSIS BY HIGH RESOLUTION NMR SPECTROSCOPY	143
J. KASPERCZYK, P. DOBRZYŃSKI, M. BERO	

CHARACTERISTIC SURFACE LAYER OF Ti6Al4V ALLOY AFTER DEFORMATION BY BENDING	146
A. KIERZKOWSKA, E. KRASICKA-CYDZIK, M. JENEK	

THE EFFECT OF PLASMA H ₂ O ₂ TREATMENT ON THE PROPERTIES OF POLYSULFONE FILMS	148
J. KOWAL, B. CZAJKOWSKA, S. MURATÓW-BODUCH, A. ORGANISCIK, B. TRYBALSKA	

WPŁYW PROMIENIOWANIA UV NA ODDZIAŁYWANIE POWIERZCHNI POLISULFONU Z KOMÓRKAMI	151
B. CZAJKOWSKA, J. KOWAL, A. BIAŁECKA, A. STOBIEŃSKA, M. PTAK, M. BOBEK, J. MARCINKIEWICZ	

STERYLIZACJA RADIACYJNA POLIURETANÓW STOSOWANYCH W INŻYNIERII TKANKOWEJ	154
G. PRZYBYTNIK, E. KORNACKA, M. BILL, J. RYSZKOWSKA	

WPŁYW STERYLIZACJI RADIACYJNEJ NA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE POLIURETANÓW DO ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZYNYCH	157
J. RYSZKOWSKA, M. BIL, G. PRZYBYTNIK	

CHARAKTERYSTYKA ORTOPEDYCZNYCH KLAMER ZE STOPU $TiNiCo$ Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU	160
Z. LEKSTON, B. WÓJCIK, H. MORAWIEC	

BIOZGODNE POWŁOKI TiN NA POLIURETANIE; MIKROSTRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI	163
R. MAJOR, E. CZARNOWSKA, R. KUSTOSZ, J.M. LACKNER, W. WALDHAUSER, P. LACKI, B. MAJOR	

HYBRYDOWE MEMBRANY I GĄBK CHITOZANOWE JAKO OPATRUNKI	167
Z. MODRZEJEWSKA, H. STOBIEŃSKA	

ZASTOSOWANIE TECHNIKI MIKROSKOPOWEJ W OBRAZOWANIU I LECZENIU WCZESNEJ ZMIANY PRÓCHNICOWEJ	169
D. PIESIAK-PAŃCZYŹYŃ, A. CZAJCZYŃSKA, U. KACZMAREK	

WPŁYW MODYFIKACJI POWIERZCHNI POLI (E-KAPROLAKTONU) NA ADHERENCJĘ OSTEOBLASTÓW W HODOWLI	175
R.M. OLKOWSKI, K. FILIPCZAK, P. ULAŃSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ	

CHARAKTERYSTYKI TRIBOLOGICZNE I FIZYKOCHEMICZNE MATERIAŁÓW NA STAŁE WYPEŁNIENIA STOMATOLOGICZNE	177
J. ROMANIUK, M. LEWANDOWSKA, K.J. KURZYDŁOWSKI, J.R. DĄBROWSKI	

KIERUNKI ROZWOJU MATERIAŁÓW KOMPOZYTOWYCH NA WYPEŁNIENIA STAŁE JAKO ALTERNATYWY AMALGAMATÓW STOMATOLOGICZNYCH	181
S. RYMKIEWICZ, B. ŚWIECZKO-ŻUREK	

BADANIA DEGRADACJI KOMPOZYTÓW CERAMICZNO-POLIMEROWYCH STOSOWANYCH NA STAŁE WYPEŁNIENIA STOMATOLOGICZNE	184
J.SIEJKA-KULCZYK, M.LEWANDOWSKA, K.J.KURZYDŁOWSKI	

MIEJSCOWA REAKCJA TKANKI KOSTNEJ PO IMPLANTACJI MATERIAŁÓW GIPSOWYCH	187
B. ŻYWIKA, J. KARAŚ, L. SOLSKI, S. PIELKA, S. MICHAŁOWSKI, J.GARCAREK, Z. JAEGERMANN, K. PORMAŃCZUK	

EFFECT OF UV RADIATION ON POLYSULFONE SURFACE-CELL INTERACTION	151
B. CZAJKOWSKA, J. KOWAL, A. BIAŁECKA, A. STOBIEŃSKA, M. PTAK, M. BOBEK, J. MARCINKIEWICZ	

RADIATION STERILIZATION OF POLYURETHANE BASED MATERIALS USED IN TISSUE ENGINEERING	154
G. PRZYBYTNIK, E. KORNACKA, M. BILL, J. RYSZKOWSKA	

THE EFFECT OF RADIATION ON PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF POLYURETHANES FOR MEDICAL APPLICATIONS	157
J. RYSZKOWSKA, M. BIL, G. PRZYBYTNIK	

CHARACTERIZATION OF ORTHOPAEDIC STAPLES FROM $TiNiCo$ SHAPE MEMORY ALLOY	160
Z. LEKSTON, B. WÓJCIK, H. MORAWIEC	

BIOCOMPATIBLE TiN COATINGS ON POLYURETHANE; MICROSTRUCTURE AND PROPERTIES	163
R. MAJOR, E. CZARNOWSKA, R. KUSTOSZ, J.M. LACKNER, W. WALDHAUSER, P. LACKI, B. MAJOR	

CHITOSAN HYBRID MEMBRANES AND SPONGES AS WOUND DRESSINGS	167
Z. MODRZEJEWSKA, H. STOBIEŃSKA	

APPLICATION OF MICROSCOPE TECHNIQUE IN REPRESENTATION AND TREATMENT OF EARLY CARIES LESION	169
D. PIESIAK-PAŃCZYŹYŃ, A. CZAJCZYŃSKA, U. KACZMAREK	

INFLUENCE OF POLY(E-CAPROLACTONE) SURFACE MODIFICATION ON OSTEOBLAST ADHESION IN CULTURE	175
R.M. OLKOWSKI, K. FILIPCZAK, P. ULAŃSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ	

TRIBOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF MATERIALS FOR DENTAL RESINS	177
J. ROMANIUK, M. LEWANDOWSKA, K.J. KURZYDŁOWSKI, J.R. DĄBROWSKI	

THE DEVELOPMENT OF MATRIX COMPOSITES INTENDED FOR STEADY FILLINGS AS ALTERNATIVES OF DENTISTRY AMALGAMS	181
S. RYMKIEWICZ, B. ŚWIECZKO-ŻUREK	

DEGRADATION PROCESSES IN CERAMIC- POLYMER COMPOSITES USED FOR DENTAL FILLINGS	184
J. SIEJKA-KULCZYK, M. LEWANDOWSKA, K.J. KURZYDŁOWSKI	

THE LOCAL REACTION OF BONE TISSUE AFTER IMPLANTATION OF GYPSUM MATERIALS	187
B.ŻYWIKA, J. KARAŚ, L. SOLSKI, S. PIELKA, S. MICHAŁOWSKI, J. GARCAREK, Z. JAEGERMANN, K. PORMAŃCZUK	

TECHNIKA OSADZANIA KOMÓREK-KLUCZOWY CZNNIK W TRÓJWYMIAROWEJ HODOWLI KOMÓREK IN VITRO	190
P. WOŹNIAK, A. CHRÓŚCICKA, R. OLKOWSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ	

WPŁYW STERYLIZACJI RADIACYJNEJ NA BIOKOMPATYBILNOŚĆ POLIURETANÓW - DOŚWIADCZENIE WSTĘPNE	193
P. WOŹNIAK, M. BIL, A. CHRÓŚCICKA, R. OLKOWSKI, G. PRZYBYTNIK, J. RYSZKOWSKA, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ	

DEGRADACJA KOMPOZYTÓW Z POLIMERÓW RESORBOWALNYCH W WARUNKACH IN VIVO	197
J. CHŁOPEK, A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ, M. ADWENT, A. CIEŚLIK-BIELECKA, M. CIEŚLIK	

WPŁYW WARSTW POŚREDNICH SiO_2 I $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ NA PRZYPĘCNOŚĆ STOP TYTANU Ti6AL4V- PORCELANA DENTYSTYCZNA	202
J. BIENIAŚ, B. SUROWSKA, M. WALCZAK, A. STOCH, H. MATRASZEK	

BEZPIECZEŃSTWO I SKUTECZNOŚĆ WYBIELANIA ZĘBÓW Z ŻYWĄ MIAZGĄ MATERIAŁEM PEROX 10%	204
D. KOŚCIELNIAK, H. KWAPIŃSKA, M. CHOMYSZYN-GAJEWSKA	

ZAGADNIENIE TRANSPORTU OBRAZU ELEKTROMAGNETYCZNYM SYGNAŁEM W OŚRODKU ELEKTRYCZNIE CZYNNYM	209
M. WÓJCIK	

MIKROSTRUKTURA ORAZ NAPRĘŻENIA WŁASNE ODLEWANYCH STOMATOLOGICZNYCH STOPÓW Ni-Cr	212
A. BRZEZIAK, S. J. SKRZYPEK, J. JURASZEK	

RUSZTOWANIA DO HODOWLI TKANKOWYCH OTRZYMYWANE Z NANO- I MIKROCZĄSTEK POLIESTROWYCH	214
S. SOSNOWSKI, S. SŁOMKOWSKI	

ALLOPLASTYCZNA PROTEZA WYROSTKA KŁYKCIOWEGO ŻUCHWY W LECZENIU ANKYLOZY STAWÓW SKRONIOWO- ŻUCHWOWYCH - OPIS PRZYPADKU	217
T. CIEŚLIK, M. ADWENT, A. CIEŚLIK-BIELECKA	

OCENA KOPOLIMERU PGLA WSZCZEPIONEGO W ŻUCHWĘ I TKANKI MIĘKKIE KRÓLIKÓW - OBSERWACJE PÓŁROCZNE	219
M. ADWENT, M. CIEŚLIK, A. CIEŚLIK-BIELECKA, D. SABAT, M. DUDA, T. CIEŚLIK	

WPŁYW WIELKOŚCI PORÓW RESORBOWALNYCH GĄBEK PGLA NA ODPOWIEDŹ TKANKOWĄ. BADANIA IN VIVO	221
E. MENASZEK, E. PAMUŁA	

WPŁYW MATERIAŁÓW ZOL-ŻELOWYCH NA HODOWLE KOMÓRKOWE	224
I. HOŁOWACZ, A. MARCINKOWSKA, H. PODBIELSKA, J. BAUER, T. BANAŚ	

CELL SEEDING TECHNIQUE-THE KEY FACTOR AFFECTING 3-D CELL CULTURE IN VITRO	190
P. WOŹNIAK, A. CHRÓŚCICKA, R. OLKOWSKI, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ	

THE INFLUENCE OF RADIOSTERILISATION ON BIOCOMPATIBILITY OF POLYURETHANES - PRELIMINARY STUDY	193
P. WOŹNIAK, M. BIL, A. CHRÓŚCICKA, R. OLKOWSKI, G. PRZYBYTNIK, J. RYSZKOWSKA, M. LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ	

IN VIVO DEGRADATION OF RESORBABLE POLYMER COMPOSITES	197
J. CHŁOPEK, A. MORAWSKA-CHOCHÓŁ, M. ADWENT, A. CIEŚLIK-BIELECKA, M. CIEŚLIK	

THE INFLUENCE OF SiO_2 AND $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ INTER- MEDIATE COATINGS ON ADHESION OF Ti6AL4V TITANIUM ALLOY-DENTAL PORCELAIN	202
J. BIENIAŚ, B. SUROWSKA, M. WALCZAK, A. STOCH, H. MATRASZEK	

SAFETY AND EFFICIENCY OF THE VITAL TEETH BLEACHING WITH PEROX 10%	204
D. KOŚCIELNIAK, H. KWAPIŃSKA, M. CHOMYSZYN-GAJEWSKA	

PROBLEM OF AN IMAGE TRANSPORTATION BY AN ELECTROMAGNETIC SIGNAL IN AN ELECTRICALLY ACTIVE OBJECT	209
M. WÓJCIK	

MICROSTRUCTURE AND RESIDUAL STRESSES OF NICKEL-CHROMIUM DENTAL ALLOY CASTINGS	212
A. BRZEZIAK, S. J. SKRZYPEK, J. JURASZEK	

SCAFFOLDS FOR CELL CULTURES PRODUCED FROM NANO- AND MICROPARTICLES	214
S. SOSNOWSKI, S. SŁOMKOWSKI	

ALLOPLASTIC PROSTHESIS OF MANDIBLE CONDYLE IN TREATMENT OF TEMPOROMANDIBULAR JOINT ANKYLOSIS	217
T. CIEŚLIK, M. ADWENT, A. CIEŚLIK-BIELECKA	

EVALUATION OF PGLA COPOLYMER IMPLANTED IN THE MANDIBLE AND SOFT TISSUE OF THE RABBIT- 24 MONTHS OBSERVATION	219
M. ADWENT, M. CIEŚLIK, A. CIEŚLIK-BIELECKA, D. SABAT, M. DUDA, T. CIEŚLIK	

THE EFFECT OF PORE SIZE OF RESORBABLE PGLA FOAMS ON THE TISSUE RESPONSE. IN VIVO STUDY	221
E. MENASZEK, E. PAMUŁA	

INFLUENCE OF SOL-GEL BIOMATERIALS ON BIOLOGICAL CELLS GROWTH IN VITRO	224
I. HOŁOWACZ, A. MARCINKOWSKA, H. PODBIELSKA, J. BAUER, T. BANAŚ	

MECHANICAL PROPERTIES OF CHEMICALLY
AND PHYSICALLY CROSSLINKED POLY(VINYL
ALCOHOL) CRYOGELS 226
M. EL FRAY, W. ŚWIĘSZKOWSKI, K.J. KURZYDŁOWSKI

REPEATABILITY OF SOL-GEL BIOCOATINGS
ON OPTICAL FIBERS EXAMINED BY
STATISTICAL PATTERN RECOGNITION
METHODOLOGY 227
J. BAUER, H. PODBIELSKA, A. ULATOWSKA-JARŻA,
I. HOLOWACZ, G. MÜLLER, J. BEUTHAN

PHYSIOLOGICAL ROLE OF BONE
PIEZOELECTRICITY: RETROSPECT
AND PROSPECT 228
S.A.M. TOFAIL

MECHANICAL PROPERTIES OF CHEMICALLY
AND PHYSICALLY CROSSLINKED POLY(VINYL
ALCOHOL) CRYOGELS 226
M. EL FRAY, W. ŚWIĘSZKOWSKI, K.J. KURZYDŁOWSKI

REPEATABILITY OF SOL-GEL BIOCOATINGS
ON OPTICAL FIBERS EXAMINED BY
STATISTICAL PATTERN RECOGNITION
METHODOLOGY 227
J. BAUER, H. PODBIELSKA, A. ULATOWSKA-JARŻA,
I. HOLOWACZ, G. MÜLLER, J. BEUTHAN

PHYSIOLOGICAL ROLE OF BONE
PIEZOELECTRICITY: RETROSPECT
AND PROSPECT 228
S.A.M. TOFAIL

VII
.....

Wersja angielska zamieszczonych artykułów jest zgodna z
dostarczoną przez autorów

BIOMATERIALS
JOURNAL

THE ROLE OF BIOMATERIAL RESEARCH IN THE FIELD OF REGENERATIVE MEDICINE

C. JAMES KIRKPATRICK

INSTITUTE OF PATHOLOGY, JOHANNES GUTENBERG UNIVERSITY,
LANGENBECKSTRASSE 1, D-55101 MAINZ, GERMANY
KIRKPATRICK@REPAIR-LAB.ORG

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),1-2]

In its historical setting biomaterials science has been an applied science, as generally a clinical application is the deliverable which directs the research activity. However, in the age of "tissue engineering" (TE) and "regenerative medicine" (RegMed) it has become abundantly clear that this scientific endeavour contains numerous fundamental material and biological issues which equally qualify biomaterials science as a basic science. The paradigm change in our conception of "biocompatibility" from the absence of cytotoxicity to the demand for proof of biofunctionality has led many scientists worldwide to look at the structural and functional elements of interfaces in Nature. The "biomimetic concept" has been coined as an attractive term for the simulation of these natural functions. An holistic analysis of natural interfaces reveals two principal elements, namely cells, and their products, one important subgroup of which are matrix components (ECM : extracellular matrix). These considerations have led to different models for implant design for TE, one of the exciting models being that of a biodegradable matrix or scaffold which contains the essential bioactive signal molecules, for example as a drug- or gene-delivery system, to elicit a physiological regenerative response, in which colonizing cells would find adhesion promoting domains, as well as substrate domains to induce cell-driven resorption by enzyme secretion [1]. The degradation characteristics must be such that the biomaterial is present long enough to permit the necessary biological reactions to take place. Thus, future success of TE applications will depend on better understanding of cell-matrix interactions and the ability to regulate the cellular response at an implant interface, preferably by using synthetic or natural polymers which resemble ECM as closely as possible.

Although the use of a biomaterial to simulate the ECM will be a natural choice in many TE applications, it is probable that some concepts for TE and RegMed will not necessarily involve a biomaterial, this certainly being the case in pure cell therapies. Nevertheless, it is evident that research endeavour in TE necessitates a strong input from the material sciences on the one hand and the life sciences on the other. In the material sciences there have been major breakthroughs in the development of so-called "intelligent materials", that is, materials which are able to respond to microenvironmental stimuli, such as changes in temperature, pH, light wavelength and even cellular enzymes [2,3]. This offers the possibility to fine-tune a scaffold or matrix for application at specific sites, such as soft tissue or within bone. Advances in knowledge of both synthetic and natural polymers, including blends of the two sources, have opened up numerous opportunities for soft and hard tissue regeneration, although the problem of mechanical stability in load-bearing applications remains to be solved.

A further significant field is that of nanofabrication, with for example the use of self-assembly molecules and the possibility to create domain structures on the surface of biomaterials. The use of nanoparticles opens up new vis-

tas for drug and gene delivery, although possible negative effects have promoted a new research area of "nanosafety". It is evident that strategies are required which permit an effective entry and targeting of the drug- and gene-delivery system (DDS and GDS resp.). Various possibilities can be conceived, depending on the tissue or organ to be targeted. Examples of biomaterial-associated DDS and GDS are coated stents for cardiovascular applications, nanoparticle targeting of the alveolo-capillary barrier in the lung and topical (skin) application of nanoparticulate systems.

In addition to the goal of designing and constructing a TE implant which is functional, a further goal must be to control the reaction of the body to the implant, or if it is an extracorporeal system, the effects of blood contact [4]. Thus, much more knowledge is required on how materials with different physical and chemical characteristics modulate the inflammatory and healing responses, as well as the specific phenotype of the cells essential to the application, such as chondrocytes and osteoblasts for cartilage and bone regeneration respectively. Central focal points of future research will be adult stem cell interactions with ECM-like scaffolds and matrices as well as deeper understanding of the signaling pathways involved. Immunological reactions at implant interfaces also remain inadequately investigated and how degradation products might elicit a specific immune reaction still remains virgin territory. Furthermore, the ability to promote rapid and physiological vascularization of TE implants will in most cases (with the exception of the anaerobic chondrocyte) determine the fate of the implant.

The complex nature of these interactions means that relevant models, both in vivo and in vitro need to be developed and extended to simulate the human in vivo state. The corollary of this is that, for example in in vitro testing schemes, more emphasis must be placed on the use of primary cells of human origin in assay systems which will yield useful data on cell functionality in interactions with biomaterials. This will involve three-dimensional culture systems, in which confocal laser scanning microscopy with relevant immunocytological methods can greatly assist monitoring functional parameters [5,6], as well as co-culture systems [7] and dynamic cultures, as in bioreactors. This increased level of complexity is regarded as essential for a deepening of our understanding of biological mechanisms, without which a rational approach to TE design will not be possible.

As the methods of genomics and proteomics become more and more applied to the field of TE, large data bases are being developed from cell culture as well as animal experimentation, this leading to the need to use the methods of systems biology to identify genes involved in the regulation of cell-scaffold interactions. It is hoped that the systems approach will further our understanding of these complex biological interactions and enable new more ECM-like scaffolds and matrices to be developed for regenerative medicine and tissue engineering. It is evident that in achieving this goal only the multidisciplinary approach will be successful.

References

- [1] Seliktar D, Zisch AH, Lutolf MP, Wrana JL, Hubbell JA. MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hydrogels for promotion of vascular healing. *J Biomed Mater Res*; A68, (2004), 704-716.
- [2] Stayton PS, Ding Z, Hoffman AS. Smart polymer-streptavidin conjugates. *Methods Mol Biol.*; 283, (2004), 37-44.
- [3] Lendlein A, Jiang H, Junger O, Langer R. Light-induced shape-memory polymers. *Nature*; 434, (2005), 879-882.
- [4] Kirkpatrick CJ, Krump-Konvalinkova V, Unger R, Bittinger F,

Otto M, Peters K. Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomolec Engineering*; 19, (2002), 211-217.

[5] Unger RE, Peters K, Huang Q, Funk A, Paul D, Kirkpatrick CJ. Vascularization and gene regulation of human endothelial cells growing on porous polyethersulfone (PES) hollow fiber membranes *Biomaterials*; 26, (2005), 3461-3469.

[6] Peters K, Schmidt H, Unger RE, Kamp G, Pröls F, Berger BJ, Kirkpatrick CJ. Paradoxical effects of hypoxia-mimicking divalent cobalt ions in human endothelial cells in vitro. *Molec Cell Biochem*; 270, (2005), 157-166.

[7] Hermanns MI, Unger RE, Kehe K, Peters K, Kirkpatrick CJ. Lung epithelial cell lines in co-culture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro. *Lab Invest*; 84, (2004), 736-752.

BIORESORBABLE HYDROGELS PREPARED FROM POLYLACTIDE/ POLY(ETHYLENE GLYCOL) BLOCK COPOLYMERS

SUMING LI

CENTRE DE RECHERCHE SUR LES BIOPOLYMERES ARTIFICIELS,
FACULTÉ DE PHARMACIE,
15 AVENUE CHARLES FLAHAULT, 34060 MONTPELLIER, FRANCE
(LISUMUNG@UNIV-MONTP1.FR)

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),2-3]

Introduction

The delivery of drugs to a human body can be achieved through oral, transdermal, topical and parenteral administrations. A great deal of work has been done during the past two decades to develop controlled drug delivery systems (DDS) adapted to these various routes. Hydrogels are of growing interest for applications as DDS because of their excellent biocompatibility due to the presence of large amounts of water [1-3]. Bioactive molecules can be physically entrapped in a hydrogel or chemically attached to the polymeric network. Hydrogels are usually formed by a hydrophilic polymer matrix crosslinked chemically through covalent bonds or physically through hydrogen bonds, crystallized domains or hydrophobic interactions. They are particularly interesting for the release of poorly soluble drugs, proteins, genes or nucleic acids [4-6].

In this work, polylactide/poly(ethylene glycol) block copolymers were prepared by ring opening polymerization of L- or D-lactide in the presence of PEG, using non toxic zinc powder as co-initiator. Hydrogels were prepared from aqueous solutions containing both PLLA/PEG and PDLA/PEG copolymers. The rheological properties and drug release behaviors of the hydrogels were investigated.

Experimental

Copolymers were synthesized by ring opening polymerization of L- or D-lactide in the presence of dihydroxyl PEG with Mn of 10000, 12000 and 20000 or monomethoxy poly(ethylene glycol) (mPEG) with Mn of 5000 by using zinc metal as catalyst.

Hydrogels were prepared by mixing predetermined amounts of PLLA/PEG and PDLA/PEG copolymers in 2 ml of distilled water. Gelation was allowed to proceed at predetermined temperatures for various periods of time. Hydrogels

containing bovine serum albumin (BSA) were prepared under similar conditions, BSA being mixed in the aqueous solution before gelation.

In vitro release experiments were realized at 37°C by immersing 2 ml of BSA-containing hydrogel in 4 ml of phosphate buffered saline (PBS). The release was regularly monitored by U.V. at 277 nm, using calibration curves obtained from standard solutions.

¹H Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded at room temperature with a Bruker spectrometer operating at 250 MHz by using DMSO-d₆ as solvent [1]. Rheological properties were determined on a Carri-Med CSL2 Rheometer of TA Instruments. The release of BSA was monitored by a Lambda 15 Perkin Elmer UV-Vis spectrophotometer. Circular dichroism (CD) spectra were registered with a Jobin Yvon CD6 instrument.

Results and discussion

Acronym	Structure	Initiator	Monomer	EO/LA	DP _{PEG}	DP _{PLA}	M _n
1L	L ₁₈ EO ₂₂₇ L ₁₉	PEG10000	L-lactide	6.1	227	38	12700
1D	D ₂₀ EO ₂₂₇ D ₂₀	PEG10000	D-lactide	5.6	227	40	13700
2L	L ₂₀ EO ₂₇₃ L ₂₀	PEG12000	L-lactide	6.8	273	40	14900
2D	D ₁₉ EO ₂₇₃ D ₁₉	PEG12000	D-lactide	7.3	273	38	14700
3L	L ₂₁ EO ₄₅₄ L ₂₁	PEG20000	L-lactide	11.0	454	42	23000
3D	D ₂₂ EO ₄₅₄ D ₂₂	PEG20000	D-lactide	10.5	454	44	23100
4L	L ₂₈ EO ₁₁₃	mPEG5000	L-lactide	4.1	113	28	7000
4D	D ₂₇ EO ₁₁₃	mPEG5000	D-lactide	4.2	113	27	6900

TABLE 1. PLA/PEG block copolymers obtained by ring opening polymerization of L(D)-lactide in the presence of PEG or mPEG

PLA-PEG-PLA triblock copolymers were synthesized by ring opening polymerization of L(D)-lactide in the presence of dihydroxyl PEG, while PLA-PEG diblock copolymers were synthesized by using mPEG5000 as initiator. Non-toxic Zn powder was used as catalyst instead of stannous octoate which can be more or less cytotoxic. TABLE 1 presents the molecular characteristics of the triblock and diblock copolymers used in this work. The molar ratio of ethylene oxide/lactyl (EO/LA) repeating units was in the range of 4 to 11 for the water solubility of the copolymers.

FIG.1A shows the evolution of storage modulus (G') and loss modulus (G'') of a 14% 1L/1D solution as a function of time at 25°C and at a frequency of 1 Hz. Initially, G'' was higher than G', the solution behaving as a viscoelastic solution. Both G' and G'' slightly decreased at first and remained constant during the first 60 min. Beyond, the moduli increased continuously, G' increasing faster than G''. A crossover point was observed at 7 h. After that, G' became higher than G'' and a hydrogel was formed. FIG.1B shows the changes of storage and loss moduli of the 14% 1L/1D sample as a function of frequency at t=0 and t=24h. Both moduli increased with increasing frequency. At t=0, the storage modulus G' was higher than the loss modulus G'', and both moduli increased almost linearly with frequency, which is characteristic of a viscoelastic liquid-like state. In contrast, at t=24h, G' became higher than G'', and both moduli tended towards a plateau at high frequency, which can be assigned to formation of a tridimensional network.

Bovine serum albumine (BSA) was retained as a model drug for release studies. The protein was mixed with the copolymer solution before gel formation. Various BSA-containing hydrogels were prepared under different gelation conditions in order to elucidate the drug release behaviors. Figure 2A shows the BSA release profiles of 20% 2L/2D hydrogels obtained after 90 h at 37°C or after 24 h at 50°C. The release rate appeared almost constant and there was almost

no burst release in both cases. On the other hand, BSA release appeared faster from the hydrogel obtained at 37°C than from the one obtained at 50°C, even though the gelation time was longer for the former than for the latter. Nearly

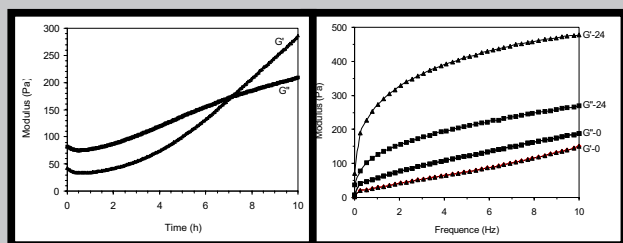


FIG. 1. A) Time-dependent changes of storage modulus (G') and viscous modulus (G'') of a 14% 1L/1D sample at 25°C and at 1Hz; **B)** Changes of storage modulus (G') and loss modulus (G'') of a 14% 1L/1D solution as a function of frequency at $t=0$ and $t=24$ h at 25°C.

38% and 24% of BSA were released after 360 h, respectively. The difference can be assigned to the fact gelation at 50°C led to much more consistent hydrogel structure than at 37°C, which disfavored drug diffusion.

Circular dichroism (CD) was used to determine whether BSA molecules were denatured after the gelation procedure. Figure 2B shows the CD spectra of original BSA and of BSA released from the hydrogel obtained at 50°C. The two spectra appeared almost identical, indicating that the gelation procedure at 50°C did not denature BSA proteins.

Conclusion

Bioresorbable hydrogels were prepared from aqueous solutions containing both PLLA/PEG and PDLA/PEG block

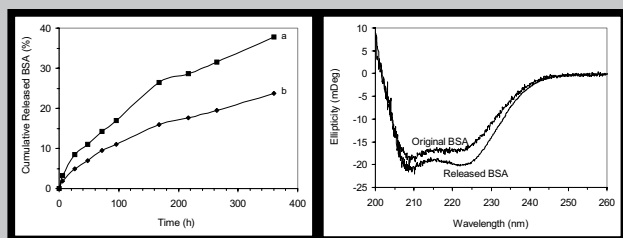


FIG. 2. A) drug release profiles of 20% 2L/2D hydrogels containing c.a. 40mg of BSA: a) gelation for 90h at 37°C, b) gelation for 24h at 50°C; **B)** Circular dichroism (CD) spectra of original BSA and of BSA released from the hydrogel obtained at 50°C.

copolymers due to interactions and stereocomplexation between PLLA and PDLA blocks. Rheological studies showed that both storage and loss moduli depend not only on the polymer properties such as the molar mass and EO/LA ratio, but also on the factors such as the concentration, temperature, time and frequency. The gelation process is time- and temperature-dependent and the hydrogel is a dynamic and evolutive system because of continuous formation/destruction of crosslinks and degradation. Drug release studies show that the release rate can be adjusted by changing the gelation conditions and factors such as drug load, polymer concentration and molar masses.

References

- [1] S. Li, M. Vert, in Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, E. Mathiowitz ed., John Wiley & Sons : New York, 1999, p 71.
- [2] R.L. Dunn, in Biomedical Applications of Synthetic Biodegradable Polymers, J.O. Hollinger ed. CRC Press: Boca Raton, 1995, pp 17-31.
- [3] S. Li, J. Biomed. Mater. Res., Appl. Biomater, 48, (1999), 142-153.
- [4] S. Li, M. Vert, Macromolecules, 36,(2003), 8008-8014.
- [5] S. Li, Macromol. Biosci., 2003, 3, 657-661.
- [6] S. Li, A. El Ghzaoui, E. Dewinck, Macromol. Symp., 222, (2005) 23-35.

ADHESION OF BONE AND VASCULAR CELLS ON CARBON FIBRE-REINFORCED CARBON COMPOSITES COATED WITH A FULLERENE LAYER

LUCIE BACAKOVA*, LUBICA GRAUSOVA*, JIRI VACIK**, IVANA JUNGOVA***

*INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACAD.SCI.CR, PRAGUE, CZECH REPUBLIC, LUCY@BIOMED.CAS.CZ

**NUCLEAR PHYSICS INSTITUTE, CAD.SCI.CR, PRAGUE, CZECH REPUBLIC; VACIK@UJF.CAS.CZ

***2ND MEDICAL FACULTY, CHARLES UNIVERSITY, PRAGUE, CZECH REPUBLIC; JUNGOVA@SEZNAM.CZ

Abstract

Carbon fibre-reinforced carbon composites (CFRC), i.e. materials promising for hard tissue surgery, were coated by a fullerene layer in order to strengthen the material surface and create its nanostructure pattern which is known to be attractive for colonization with bone cells. The fullerene layer was relatively resistant to wear, at least swabbing with cotton, rinsing with liquids and exposure to cells and proteolytic enzymes. Both human osteoblast-like MG 63 cells and rat vascular smooth muscle cells (VSMC) in 1- and 2-day-old cultures adhered to these surfaces in lower numbers in comparison with the control uncoated material and tissue culture polystyrene. In addition, the VSMC on the fullerene-coated surfaces were less spread. The lower cell adhesion was probably due to a relatively high hydrophobicity of fullerenes. On the other hand, the spreading of MG 63 cells was comparable to that observed on the control surfaces, and these cells also assembled dot-like vinculin-containing focal adhesion plaques and relatively rich fine filamentous beta-actin cytoskeleton. We suppose that the cell adhesion may be enhanced by derivatization of fullerenes with specific chemical functional groups or peptidic ligands for cell adhesion receptors.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),3-6]

Introduction

Fullerenes are spheroidal molecules made exclusively of carbon atoms (e.g., C_{60} , C_{70}). Similarly as carbon nanotubes, and nanodiamonds, fullerenes are considered

3

as promising building blocks for the construction of novel nanomaterials, especially for molecular electronics. In addition, these molecules display a diverse range of biological activity. Their unique hollow cage-like shape and structural analogy with clathrin-coated vesicles in cells as well as their reactivity allowing for immobilization of various molecules on their surface support the idea of the potential use of fullerenes as drug or gene delivery agents [1, 2]. In their pristine unmodified state, fullerenes are highly hydrophobic, water-insoluble, able to accept and release electrons, and relatively highly reactive, which enables them to be structurally modified. When irradiated with UV or visible light, fullerenes can convert molecular oxygen into highly reactive singlet oxygen. Thus, they have the potential for inflicting photodynamic damage on biological systems, including damage to cellular membranes or DNA cleavage. This harmful effect can be exploited for photodynamic therapy against tumors, viruses and bacteria resistant to multiple drugs. On the other hand, C_{60} is considered to be the world's most efficient radical scavenger. This is due to the relatively large number of conjugated double bonds in the fullerene molecule, which can be attacked by radical species. Thus, fullerenes would be suitable for applications in quenching oxygen radicals [3,4].

However, relatively little is known about the influence of fullerenes on cell-substrate adhesion. A thin layer of fullerene molecules may enhance the cell adhesion on various biomaterials by its nanostructure arrangements (i.e., the presence of fullerene clusters or crystallites less than 100 nm), which resembles the architecture of physiological extracellular matrix (ECM), i.e. a structure composed from nanoscale proteins, and in the case of bone, also hydroxyapatite and other inorganic nanocrystals [5-7]. Therefore, we investigated adhesion of human osteoblast-like cells of the line MG-63 in cultures on carbon fibre-reinforced carbon composites, i.e. materials considered as promising for bone tissue engineering, coated with a thin fullerene layer. In addition, we studied adhesion of vascular smooth muscle cells, i.e. another important cell type present in the bone, moreover capable of osteogenic differentiation [8].

Material and methods

Two-dimensionally reinforced CFRC were prepared in the Institute of Rock Structure and Mechanics, Acad. Sci. CR, Prague [3]. Commercially available woven fabric made

of carbon fibres Toray T 800 was arranged in layers, infiltrated with a carbon matrix precursor (phenolic resin UMAFORM LE, Synpo Ltd., Pardubice, CR), pressed, cured, carbonised at 1000°C, graphitised at 2200°C and finally graphitised at 2200°C. In order to decrease the material surface micro-scale roughness, non-appropriate for cell spreading [8], the CFRC were ground using metallographic paper of 4000 grade.

Thin fullerene (C_{60}) layers, deposited on the CFRC, were prepared by evaporation of C_{60} in the Leybold Univex-300 vacuum system. In order to synthesize high quality C_{60} coverings, suitable deposition kinetics is necessary. Thus, the C_{60} /CFRC samples were prepared at room temperature (of the substrates) with a deposition rate ≤ 1 Å/s (the temperature of C_{60} evaporation in the Knudsen cells was 400°C), and time of deposition of about 15 min. The thickness of the fullerene layers was estimated to be <100 nm. FIG. 1 (showing a typical result of the Raman analysis) confirms that the fullerene films were prepared with a high quality with no fragmentation or graphitization of C_{60} . One third of the CFRC samples (3x3 cm) was protected of fullerene coating using a mask. Other completely uncoated CFRC samples as well as tissue culture polystyrene dish served as controls.

The samples were repeatedly rinsed in phosphate-buffered saline and inserted on the bottom of polystyrene Petri dishes (diameter 5 cm; GAMA, Ceske Budejovice, CR). The sterilization was avoided in order to prevent possible damage of fullerenes by heat, irradiation or chemicals, and the samples were used for short-term cell culture only. They were seeded with human osteoblast-like MG 63 cells (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) or vascular smooth muscle cells (VSMC) obtained from the thoracic aorta of adult male Wistar rats [3]. Each dish contained 300,000-500,000 cells (i.e., 15,000-25,000 cells/cm² and 7 ml of Dulbecco Minimum Essential Medium supplemented with 10% of fetal bovine serum and 40 µg/ml of gentamicin. Cells were cultured for 1-2 days 37°C in humidified air atmosphere containing 5% of CO₂, fixed with 70% ethanol and stained with propidium iodide. In addition, two molecules participating in the process of cell adhesion and spreading, namely vinculin, an integrin-associated protein, and beta-actin, important component of the cytoplasmatic cytoskeleton, were visualized by immunofluorescence staining [5,8,10].

Results and discussion

Grinding with metallographic paper of 4000 grade lowered the surface roughness of CFRC about twice. As measured by a profilometer (Rank Taylor Hobson Ltd., England), the departures of the roughness profile from the mean line (i.e., R_a parameter) decreased from $6.5 \pm 1.8 \mu\text{m}$ to $3.5 \pm 0.6 \mu\text{m}$, and the mean spacing of the adjacent local peaks (parameter S) lengthened from $38 \pm 11 \mu\text{m}$ to $96 \pm 49 \mu\text{m}$. Fullerene coating did not change significantly this surface microroughness but created a nanostructured pattern on the pre-existing microarchitecture of the CFRC surfaces. This nanopattern was expected to enhance adhesion of cells, especially those bone-derived, because recently, a very interesting finding has been reported that nanostructured surfaces can enhance the adsorption of vitronectin, i.e. an extracellular matrix protein mediating preferential adhesion of osteoblasts over other cell types [5, 6]. However, on day 2 after seeding, the MG-63 cells adhered to the fullerene-coated CFRC in a significantly lower number than on uncoated CFRC, glass or standard tissue culture polystyrene. Similar reaction was also observed in 1-day-old cultures of VSMC (FIG.2A,B). In addition, the VSMC on

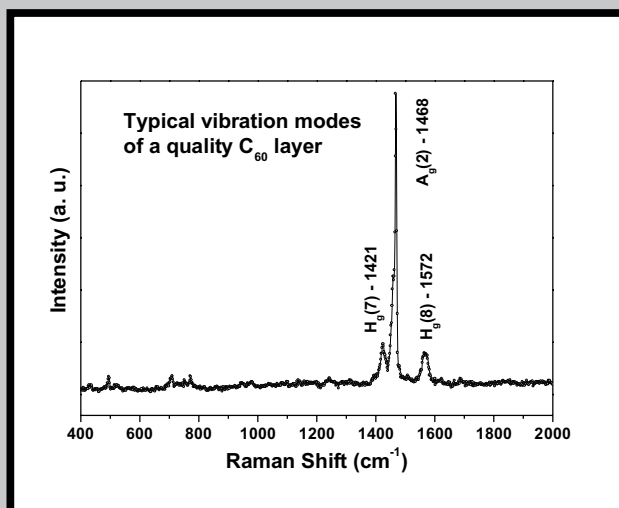


FIG. 1. Raman analysis of a thin C_{60} layer deposited on a CFRC substrate.

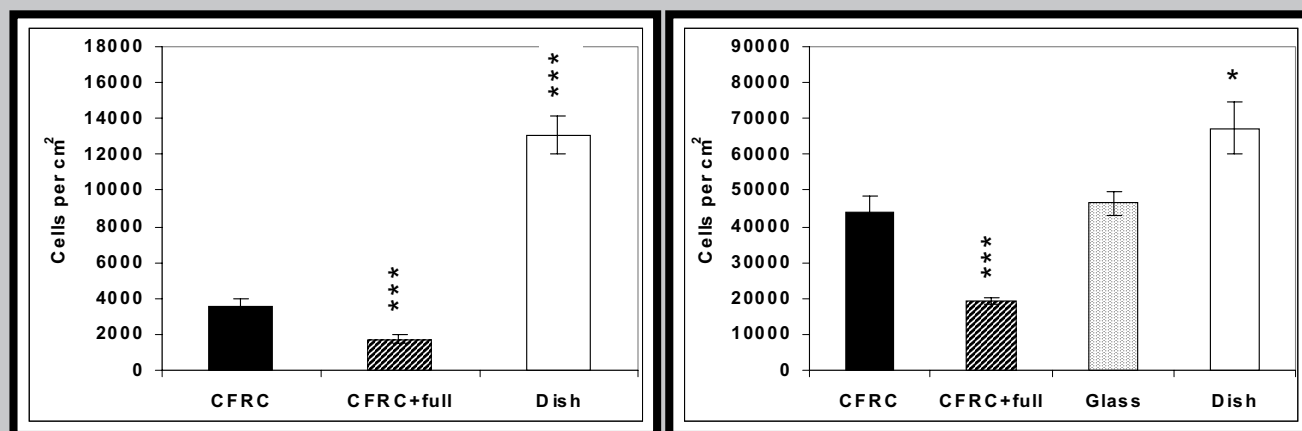


FIG. 2. Number of rat aortic smooth muscle cells (A) and osteoblast-like MG 63 cells (B) on carbon fibre-reinforced carbon composites (CFRC), CFRC coated with fullerenes (CFRC+full), glass coverslips (Glass) and standard polystyrene tissue culture dish (Dish) on day 2 (A) and 1 (B) after seeding. Average \pm SEM from 12-21 microscopic fields, Student's t-test for unpaired data. Statistical significance: *** $p \leq 0.001$, * $p \leq 0.02$ in comparison with CFRC.

an important limitation of the potential biomedical use of CFRC [8].

In comparison with VSMC, the cell spreading area of MG 63 cells on the fullerene-coated CFRC was found to be significantly higher ($3182 \pm 670 \mu\text{m}^2$) than that on the uncoated material ($1888 \pm 400 \mu\text{m}^2$) and even on polystyrene dishes ($1300 \pm 102 \mu\text{m}^2$). This could be explained by the low cell population density on the fullerene layer, which provided the cells with more space for their spreading. On the other hand, the fullerene layer might promote the preferential adhesion of osteoblasts by its nanostructure [5,6]. On the

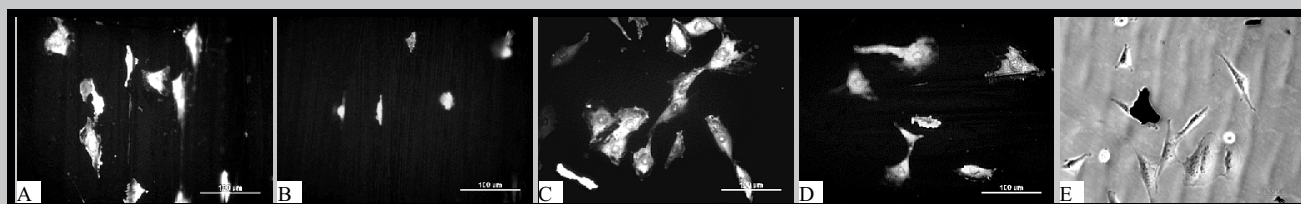


Fig. 3. Rat aortic smooth muscle cells on CFRC (A), CFRC coated with fullerenes (B), standard polystyrene tissue culture dish (C), uncoated region of a fullerene-coated CFRC sample (D), polystyrene dish with a fullerene-coated CFRC sample (E). Day 1 after seeding; fixed and stained with propidium iodide (A-D) or living unfixed cells

the fullerene layer were less spread, i.e. round or spindle-shaped, whereas on the pure CFRC and especially on the tissue culture polystyrene, they were mainly polygonal and of a larger cell-material contact area (FIG.3A-D).

The lower cell adhesion on the fullerene layer was probably due to the hydrophobic character of the non-derivatized fullerene molecules [3]. It is known that hydrophobic materials promote preferential adsorption of cell non-adhesive proteins from the serum of the culture media, such as albumin. In addition, the cell adhesion-mediating ECM proteins are adsorbed in relatively rigid state, thus their specific amino acid sequences are less accessible for cell adhesion receptors [10]. Penetration of fullerenes into cells and their cytotoxic action is less probable, because the cell attachment and spreading on the control uncoated regions of the fullerene-modified CFRC (FIG.3D), as well as on the bottom on polystyrene dishes containing fullerene-coated samples (FIG.3E), were similar as in control polystyrene dishes without fullerene samples. In addition, the fullerene layer was resistant to mild wear, represented by swabbing with cotton, rinsing with liquids (water, phosphate-buffered saline, culture media) and exposure to cells and proteolytic enzymes used for cell harvesting. The fullerene-coated CFRC surfaces seemed to be stronger and less prone to release carbon particles (the latter see on Fig. 3E), which is

fullerene layer, these cells formed fine dot-like vinculin-containing focal adhesion plaques and fine network of actin microfilaments (FIG.4), which is a sign of effective binding between cell adhesion receptors and ECM proteins adsorbed on the material surface [5,10]. In the future experiments, we plan to reduce the hydrophobia of fullerenes by their derivatization with oxygen-containing and amine groups, or to induce the receptor-mediated cell adhesion by functionalization of fullerenes with oligopeptides containing amino acid sequences RGD or osteoblast-specific KRSR [5,6,10]. A water soluble fullerene derivative, C3-fullero-tris-methanodicarboxylic acid, maintained the integrity of focal adhesion plaques and actin cytoskeleton in a UV-irradiated line of human epidermoid carcinoma cells by quenching oxygen radicals [4]. Enhanced attachment and spreading of platelets was also found on a polyurethane surface grafted with fullerene C_{60} molecules [11]. In addition, fullerene derivatives selectively targeting the bone tissue, delivering diagnostic and therapeutic agents and influencing bone tissue mineralization can also be constructed [1].

Conclusions

Coating of carbon-fibre reinforced carbon composites, i.e. promising materials for bone tissue engineering, with a fullerene layer reduced the number of osteoblast-like MG 63 cells or vascular smooth muscle cells adhering to these materials in vitro. The latter cell type was also less spread, whereas the spreading of MG 63 cells was comparable to that observed on the uncoated composites or tissue culture polystyrene. The cell adhesion may be further enhanced by derivatization of fullerenes with chemical functional groups or oligopeptidic ligands for cell adhesion receptors.

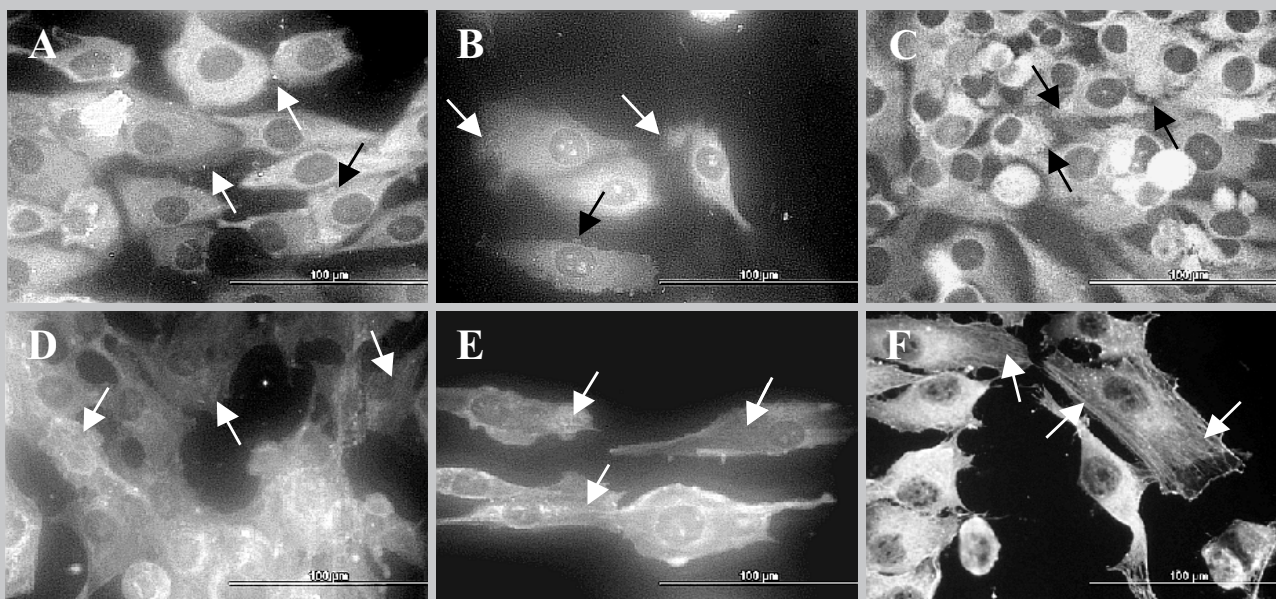


FIG. 4. Immunofluorescence staining of vinculin (A-C) and beta-actin (D-F) in MG 63 cells on day 2 after seeding on CFRC (A,D), fullerene-coated CFRC (B,E) or standard polystyrene tissue culture dish (C, F). Arrows indicate vinculin-containing focal adhesion plaques (A-C) or beta-actin filament bundles (D-F).

Human osteoblast-like cells MG 63 in cultures on polymer-carbon-alginate composites

LUBICA GRAUSOVA*, LUCIE BACAKOVA*, EWA STODOLAK**, STANISLAW BLAZEWCZ**, TERESA MIKOŁAJCZYK***

*INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACAD. SCI. CR, VIDENSKA 1083, 142 20 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC;

GRAUSOVA@BIOMED.CAS.CZ

**AGH - UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, KRAKOW, POLAND

***TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, FACULTY OF TEXTILE ENGINEERING AND MARKETING, DEPARTMENT OF MAN-MADE FIBRES, LODZ, POLAND

Acknowledgements

Supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Project COST, Action 527.130, grant No. 1P05OC012), and by a research project No. AV0Z 50110509 of the Inst. Physiol., Acad. Sci. CR. We also thank Dr. Věra Lisá for maintaining the primary and line cells in culture and Mrs. Ivana Zajánová for her excellent help with the immunofluorescence staining.

References

- [1] Gonzalez KA, Wilson LJ, Wub W, Nancolla GH: Bioorg Med Chem 10: 1991-1997, 2002.
- [2] Martin CR, Kohli P.: Nat Rev Drug Discov 2: 29-37, 2003.
- [3] Jensen AW, Wilson SR, Schuster DI: Bioorg Med Chem. 4:767-779, 1996.
- [4] Straface E, Natalini B, Monti D, Franceschi C, Schettini G, Bisaglia M, Fumelli C, Pincelli C, Pellicciari R, Malorni W: FEBS Lett 454: 335-340, 1999.
- [5] Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R: J Biomed Mater Res 51: 475-483, 2000.
- [6] Price RL, Ellison K, Haberstroh KM, Webster TJ: J Biomed Mater Res 70A: 129-138, 2004.
- [7] Tan J, Saltzman WM: Biomaterials 25: 3593-3601, 2004.
- [8] Bacakova L, Sary V, Kofronova O, Lisa V: J Biomed Mater Res. 2001; 54(4):567-78.
- [9] Bacakova L, Filova E, Rypacek F, Svorcik V, Sary V. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. Physiol Res 53 Suppl 1: S35-45, 2004.
- [10] Lin JC, Wu CH: Biomaterials 20: 1613-1620, 1999.

Abstract

Adhesion and growth of human osteoblast-like MG 63 cells (seeding density of 17964 cells/cm²) was studied in cultures on the following 7 groups of artificial materials developed for bone tissue engineering: terpolymer of polypropylene, polytetrafluorethylene and polyvinylidene fluoride (CP0), terpolymer reinforced with carbon fibres (CP4) or carbon fabric (CP5), terpolymer reinforced with carbon fibres and with pores created by addition and dissolution of alginate fibres (CP6) or powder (CP7), terpolymer reinforced with carbon fibres and containing the alginate powder (CP8) or fibres (CP9). On day 1 and 3 after seeding, the numbers of MG63 cells on all tested materials was similar to the values obtained on the control polystyrene culture dish (PS). However, on day 7, the cell number, ranging from 17766±3180 to 67002±6850 cells/cm², increased in the following order: CP0<PS<CP6<CP8<CP7<CP5<CP4<CP9, which suggest a supportive role of carbon and alginate components of the materials on their colonization with cells. [Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),6-9]

Introduction

In recent years, artificial materials are of growing importance in medicine and biology. A modern scientific interdis-

ciplinary field known as Tissue Engineering has been developed to design artificial biocompatible materials in order to substitute irreversibly damaged tissues and organs [1-6]. Nowadays it is very trendy to study carbon materials for potential biomedical use. Carbon is an important component of cells and tissues, so that these materials could be well tolerated by the surrounding tissue. In addition, their mechanical properties (e.g. the density, porosity, modulus of elasticity) can be tailored to be very close to the bone. Thus, these materials are very promising for the use in orthopaedic and dental surgery.

Our earlier studies showed that carbon-carbon composites (i.e., carbon fibre-reinforced carbon composites, referred as CFRC) supported adhesion and growth of osteogenic as well as vascular endothelial and smooth muscle cells in vitro, especially after modifications of the CFRC surface by grinding with metallographic paper, polishing with colloidal SiO₂ or diamond paste and deposition of various bioactive layers, such as pyrolytic graphite, Ti/C:H, Ag/C:H with low silver concentration or even fullerenes C₆₀ [7-10]. Despite of these encouraging results, the CFRC manifested a relative high tendency to release carbon particles, which is mainly due to the brittleness of the carbon matrix [7,8]. Therefore, in the present study, we constructed carbon-polymer composites, i.e. materials in which the carbon matrix was replaced by a polymeric resin. These new-generation composites were expected to be more resistant to the material disintegration and supportive for colonization with osteogenic cells. Some composites were enriched with alginates, i.e. nature-derived polysaccharides containing uronic acids, which are considered as promising biomaterials for tissue engineering, such as construction of bioartificial cartilage [2,3], myocardium [4] or skeletal muscle [5]. Another perspective application of alginates is encapsulation of transplanted cells, such as hormone-secreting cells (parathyroid and pancreatic islet cells [2,11-13]) or genetically-engineered tumour-killing cells [1,14].

Material and methods

Carbon fibres in the form of plaited fabrics were obtained at the Department of Advanced Ceramics, University Science and Technology, Krakow, Poland. A special epoxide resin covering the fibres was removed in an oxidizing atmosphere 35 min/400°C. In order to obtain short carbon fibres (diameter 7.05±0.23 µm, length 1.2±0.25 mm), the carbon fabric was cut in a special mechanical mill.

A terpolymer of polypropylene, polytetrafluorethylene and polyvinylidene fluoride (PTFE/PVDF/PP, density 1.600, purchased from Aldrich Chemical Co., USA, Cat. No. 45 458-3) was dissolved in acetone (POCh SA, Gliwice, Poland, Cat. No. 102480111; 5g of PTFE/PVDF/PP polymer resin per 50 ml of acetone), and the following 7 groups of samples were prepared:

1-CP0. Pure PTFE/PVDF/PP polymer samples; the terpolymer solution was poured onto glass Petri dishes and left to freely evaporate for 2 days.

2-CP4. Terpolymer with short carbon fibres; the fibres suspended in acetone were distributed on Petri dishes, and then the terpolymer solution was poured onto them and left to freely evaporate for 2 days.

3-CP5. Terpolymer with plaited fabrics which had regular packing fibres; the terpolymer solution was poured onto the fabrics inserted in Petri dishes and left to freely evaporate for 2 days.

4-CP6. Terpolymer with short carbon fibres and alginate fibres; the latter were obtained at the Department of Man-Made Fibres, Faculty of Textile Engineering and Marketing,

Technical University of Lodz, Poland. The content of acid's radicals in the alginate was 65-75% for guluronic acid and 25-35% for mannuronic acid. In the first step, both types of fibres in acetone were distributed on Petri dishes, and in the next step, the polymer solution was poured onto them and left to freely evaporate for 2 days. Then the alginate fibres were removed in hot water (85°C/28h) in order to create gaps of the diameter of 5.2±0.25 mm. These gaps were probably open pores penetrating the whole thickness of the material membranes, i.e., 178 mm).

5-CP7. Terpolymer with short carbon fibres and alginate powder; the latter were purchased from the same company as the alginate fibres, and were of the same chemical composition. In the first step, both fibres and powder were suspended in acetone and distributed on Petri dishes, and in the next step, the polymer solution was poured onto them and left to freely evaporate for 2 days. Then the alginate powder was removed in hot water (85°C/28h), and gaps of the size of 1.8±0.15 mm were created. Similarly to the sample CP6, the gaps probably penetrated through the entire thickness of the material sheet (which was thinner than in CP6), thus their depth was 168 mm.

6-CP8. Terpolymer containing short carbon fibres and alginate powder; both fibres and powder in acetone were distributed on Petri dishes, and then the polymer solution was poured onto them and left to freely evaporate for 2 days.

7-CP9. Terpolymer containing short carbon fibres and alginate fibres; both types of fibres were suspended in acetone, distributed on Petri dishes and then the polymer solution was poured onto them and left to freely evaporate for 2 days.

The surface characterization was accomplished by contact angle measurements. As the comparative liquid, twice distilled water was used (TABLE 1).

For cell cultivation, thin circular sheets of the materials (diameter 1.67 cm) were sterilized by H₂O₂ - plasma method (Sterrad 120, ASP, Johnson & Johnson), inserted in polystyrene 24-well-multidishes (TPP, Switzerland), seeded with human osteoblast-like cells of the line MG63 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) at the initial density of 17000 cells/cm², and incubated in 1.5 ml of Dulbecco-modified Eagle Minimum Essential Medium (Sigma, U.S.A., Cat. No D5648) supplemented with 10% foetal bovine serum (Sebak GmbH, Aidenbach, Germany) in humidified air atmosphere containing 5% of CO₂. On day 1 and 3 after seeding, cells were fixed with 70% ethanol, stained with propidium iodide (5µg/ml), and their number and morphology were evaluated in a fluorescence microscope. On day 7, cells were harvested by trypsin-EDTA solution (Sigma, U.S.A.; exposure 10 min at 37°C) and counted in a Bürker's haemocytometer.

Quantitative data were presented as means ± SEM (Standard Error of Mean) from 8-18 measurements obtained from 3 samples for each experimental group).

Sample name	Contact angle [°]	Surface energy [mN/m ²]	Dispersion component [mN/m ²]	Polar component [mN/m ²]
CP0	99.7±2.5	20.31±1.62	18.31±1.31	2.00±0.31
CP4	87.2±2.5	24.00±0.76	23.59±0.69	0.40±0.07
CP5	99.6±2.66	20.15±0.52	18.25±0.27	1.86±0.38
CP6	78.4±3.25	20.28±0.61	17.52±0.43	2.76±0.17
CP7	67.8±2.94	21.52±1.74	18.35±0.86	2.29±0.73
CP8	83.5±2.86	26.25±0.98	23.52±0.82	2.73±0.18
CP9	88.8±4.25	31.18±1.15	25.92±0.77	5.26±0.54

TABLE 1. Results of contact angle measurements on carbon-polymer composites.

8 Results and discussion

On day 1 and 3 after seeding, the numbers of MG 63 cells on all carbon-polymer composites as well as the pure terpolymer were similar to the value obtained on the control polystyrene culture dish (PS). The latter values amounted to 2694 ± 424 cells/cm² and 11349 ± 1968 cells/cm² on day 1 and 3, respectively. However, on day 7 after seeding, the highest number of MG 63 cells (67002 ± 6850 cells/cm²) was found on the sample CP9 (i.e., the carbon fibre-reinforced terpolymer containing alginate fibres). This number was more than twice higher than that obtained on standard tissue culture polystyrene (FIG.1,2). This result could be due to a soft and sponge-like structure of the alginate, which allowed the cells to penetrate inside the material, and thus to use more space for their expansion. Also the relatively high surface energy, especially its polar component (TABLE 1) might contribute to the highest cell colonization of the CP9 sample [6,15]. Another explanation is direct mitogenic action of alginates due to the presence of various contaminants [2,11,16], their attractiveness for protein adsorption [12], as well as their stimulatory effects on production of growth-promoting substances in adjacent cells [1,11,13]. However, the supportive action of alginates on cell colonization could be associated with immune activation of these cells, manifested by increased expression of immunoglobulin and selectin adhesion molecules and synthesis of cytokines, followed by infiltration and encapsulation of the implant with inflammatory cells and fibroblasts [2,8,11-13,16]. From this point of view, the composites CP4 (carbon fibre-reinforced terpolymer) and CP5 (carbon fabric-reinforced terpolymer) seem to be more advantageous, because their chemical composition (i.e., absence of alginates) may be less immunogenic. Similarly to CP9, also on these composites relatively high cell numbers were found on day 7 after seeding (60911 ± 5478 cells/cm² on CP4 and 54820 ± 5625 cells/cm² on CP5; FIG.1 and 2 C, D). On CP 5, this number might be even higher, because as detected by propidium iodide staining, a considerable amount of cells were retained inside the carbon fabric even after cell harvesting by trypsinization. Similarly on CP4, some cells were localized below the carbon fibres, prominent on the material surface (FIG.2D). Interestingly, on CP5, cells were mainly of longitudinal shape and oriented along the fibres forming the carbon fabric (FIG.2C). Similar influence of the material surface topography on the cell morphology was also observed in the CFRC [7, 8].

The lowest number of MG63 cells was found on the pure terpolymer PTFE/PVDF/PP (sample CP0; 17766 ± 3180 cells/cm²). In addition, the cells on this material were less spread and distributed less homogeneously (FIG.2E). These findings could be attributed to a relatively high surface hydrophobia of the terpolymer (TABLE 1). It is known that cell adhesion on artificial materials is mediated by adsorption of extracellular matrix molecules, e.g. vitronectin, fibronectin, collagen and laminin, provided by the serum of the culture media or synthesized by cells [6,15]. If the material is too hydrophobic, these molecules are adsorbed in a rigid state and less appropriate spatial conformation, so that their specific binding sites, e.g. amino acid sequence RGD, are less accessible for adhesion receptors on cells [6,15]. The hydrophobicity of the PTFE/PVDF/PP terpolymer could be lowered by physical methods described earlier, such as bombardment with ions, irradiation with ultraviolet light or exposure to plasma discharge (for review see [6]). Also other physical and chemical properties of the material surface, such as electrical charge, roughness and topography, mechanical properties (rigidity or flexibility) or presence of certain chemical functional groups (amine or oxygen-contain-

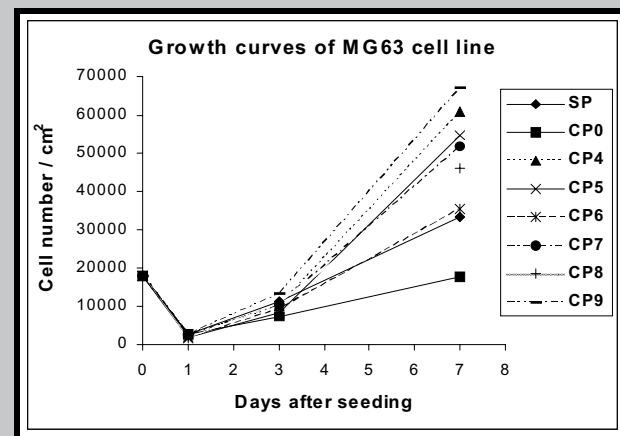


FIG. 1. Growth curves of human osteoblast-like MG63 cells on polystyrene culture dish (SP), terpolymer PTFE/PVDF/PP (CP0) and carbon-terpolymer composites (CP4-CP9; see the Material and methods).

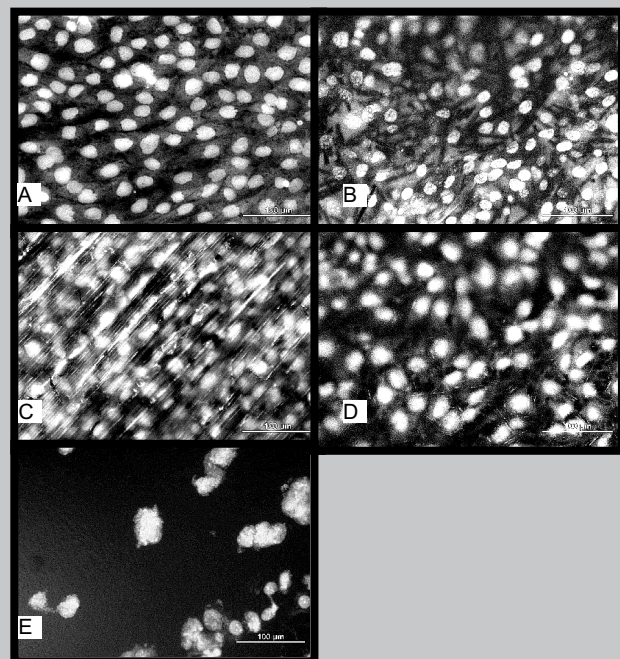


FIG. 2. Morphology of human osteoblast-like MG 63 cells on: Polystyrene culture dish (A), Sample CP9 (B), Sample CP5 (C), Sample CP4 (D) and Sample CP0 (E) (See the Material and methods). Day 7 after seeding, fixed with ethanol, stained with propidium iodide.

ing groups), are known to influence markedly the protein adsorption and cell adhesion [1, 6-10,12-13, 15, 16].

Conclusion

On day 7 after seeding, the lowest number of human osteoblast-like MG63 cells was found on the pure terpolymer of polypropylene, polytetrafluorethylene and polyvinylidene fluoride, which was probably due to its relatively high surface hydrophobia. The cell colonization was markedly improved and the maximum cell number was achieved when the terpolymer was modified by addition of carbon and alginate fibres (sample CP9).

Acknowledgements

Supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project COST, Action 527.130, grant No. 1P05OC012), and by a research project No. AV0Z 50110509 of the Inst. Physiol., Acad. Sci. CR. We also thank Dr. Vera Lisa for her excellent assistance with cell culture technique.

References

- [1] Klock G, Pfeiffermann A, Ryser C, Grohn P, Kuttler B, Hahn HJ, Zimmermann U: *Biomaterials* 18: 707-713, 1997.
- [2] Jork A, Thurmer F, Cramer H, Zimmermann G, Gessner P, Hamel K, Hofmann G, Kuttler B, Hahn HJ, Josimovic-Alasevic O, Fritsch KG, Zimmermann U: *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 224-229, 2000.
- [3] Stevens MM, Marini RP, Martin I, Langer R, Prasad Shastri V: *J Orthop Res* 22: 1114-1119, 2004.
- [4] Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T: *Biomaterials* 24: 2309-2316, 2003.
- [5] Kamelger FS, Marksteiner R, Margreiter E, Klima G, Wechselberger G, Hering S, Piza H: *Biomaterials* 25: 1649-1655, 2004.
- [6] Bacakova L, Filová E, Rypacek F, Svoricik V, Sary V: *Physiol Res* 53 (Suppl. 1): S35-S45, 2004.
- [7] Bacakova L, Sary V, Kofronova O, Lisa V: *J Biomed Mater Res* 54: 567-578, 2001.
- [8] Bacakova L, Sary V, Glogar P, Lisa V: *Inzynieria Biomaterialów-Engineering of Biomaterials*, 6 (8-9), 2003.
- [9] Bacakova L, Noskova L, Koshelyev H, Biederman H: *Inzynieria Biomaterialów-Engineering of Biomaterials*, 7 (37) 18-20, 2004.
- [10] Bacakova L, Grausova L, Vacik J, Jungova I: Extended abstract, accepted for the conference "Carbon 2005", Gyeongju, Korea, July 3 -7, 2005.
- [11] King A, Sandler S, Andersson A: *J Biomed Mater Res* 57:374-383, 2001.
- [12] de Vos P, van Hoogmoed CG, de Haan BJ, Busscher HJ: *J Biomed Mater Res* 62: 430-437, 2002.
- [13] Bunger CM, Gerlach C, Freier T, Schmitz KP, Pilz M, Werner C, Jonas L, Schareck W, Hopt UT, de Vos P: *J Biomed Mater Res* A. 67:1219-1227, 2003.
- [14] Cirone P, Shen F, Chang PL: *Cancer Gene Ther* 12: 369-380, 2005.
- [15] Groth T, Altankov G, Kostadinova A, Krasteva N, Albrecht W, Paul D: *J Biomed Mater Res* 44, 341-351, 1999.
- [16] Leinfelder U, Brunnenmeier F, Cramer H, Schiller J, Arnold K, Vasquez JA, Zimmermann U: *Biomaterials* 24: 4161-4172, 2003.

ADHESION AND GROWTH OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS ON PROTEIN ASSEMBLIES FOR BIOMATERIAL COATING

ELENA FILOVÁ*, **, EDUARD BRYNDA***, MILAN HOUSKA***, TOMÁŠ RIEDEL***, L. BAČÁKOVÁ*, **

*INSTITUTE OF PHYSIOLOGY, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, VIDENSKA ST. 1083, 142 00 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC, E-MAIL: FILOVA@BIOMED.CAS.CZ;

**CENTRE OF CARDIOVASCULAR RESEARCH, VIDENSKA ST. 1083, 142 00 PRAGUE 4-KRC, CZECH REPUBLIC;

***INSTITUTE OF MACROMOLECULAR CHEMISTRY, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, HEYROVSKY SQ. 2, 162 06 PRAGUE 6, CZECH REPUBLIC

Abstract

We investigated adhesion and growth of vascular smooth muscle cells (VSMC) on protein assemblies prepared by coating of thin fibrin net with ultrathin layer of collagen I, fibronectin or laminin. The assemblies were deposited on polystyrene (PS) non-modified with plasma discharge, i.e. a treatment commonly used for creation of surfaces suitable for cell cultivation. All samples with fibrin assemblies improved initial attachment and spreading of VSMC as well as their subsequent growth in comparison with the pristine PS. The adhesion area of VSMC increased on fibrin coated with collagen I and fibronectin, while on laminin it remained similar as that on the pure fibrin. Thin 3D fibrin net markedly changed the morphology of VSMC from polygonal to star-like shape with protrusions. Cells all tested samples formed vinculin-containing focal adhesion plaques and α -actin cytoskeleton, an important marker of VSMC differentiation. The protein assemblies can be used for improvement of cell adhesion and growth on various artificial materials used in tissue engineering, e.g. for construction of bioartificial vascular prostheses.

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),9-12]

Introduction

Artificial implants into the human body are often made of bioinert materials not allowing colonization with cells, thus these materials cannot be considered as adequate and long lasting substitutes of the natural tissues. The latter concerns especially currently used vascular prostheses made of polyethylene terephthalate or polytetrafluoroethylene, i.e. highly hydrophobic polymers not supporting vascular tissue regeneration. Therefore, there is an effort to improve the cell adhesion and spreading by various physical and chemical modification of the material surface, e.g. by irradiation with ultraviolet light (Heitz et al. 2003), bombardment with C^+ , O^+ and other ions (Bačáková et al. 2001), plasma discharge, covalent binding of ligands for cellular adhesion receptors, e.g. RGD, REDV (Bačáková et al. 2004, Benoit and Anseth 2005) or controlled deposition of layers containing extracellular matrix (ECM) molecules (Brodie et al. 2005).

In the present study, we evaluated the adhesion and growth of VSMC on fibrin assemblies on polystyrene, and the influence of coating these assemblies with collagen I, fibronectin or laminin, important components of the ECM in blood vessels.

Material and methods

Series of biomolecular assemblies on polystyrene surfaces (PS) were prepared at room temperature in wells of tissue culture plates non-treated with plasma discharge (Polystyrene Non-Tissue Treated Plate, 24 wells of diameter 1.5 cm, Falcon Multiwell TM). Five columns, each containing 4 wells, on a plate were coated with different assemblies; the sixth column was left uncoated as a reference sample. Fibrin (Fb) network was attached to PS surface and further coated with fibronectin (FN), laminin (La) or collagen I (CO I), or mixed with CO I. Therefore, we prepared the following samples: 1. PS- Fb, 2. PS- Fb/FN, 3. PS- Fb/La, 4. PS- Fb/CO I (i.e., collagen-coated Fb), 5. PS- (Fb+CO I), i.e. Fb mixed with collagen, 6. PS.

The preparation of assemblies on PS was started with adsorption of fibrinogen (Fbg) from TB (TRIS buffer, 50 mM

0.1 M NaCl, pH 7.4) at 2 µg/ml for 1 hour. Then Fbg molecules in the adsorbed monolayer were converted to Fb with thrombin, 2 NIH U/ml, in TB for 10 minutes. After washing the surface with TB solution of Fbg 200 µg/ml in TB was added. During the following 15 minutes, the Fbg molecules present in solution in the vicinity of the surface were converted to Fb by enzymatic activity of thrombin molecules irreversibly bound to the primary Fb monolayer, and an Fb fiber network grew up from the surface. FN at 50 µg/ml, La at 50 µg/ml, and CO I 100 µg/ml were adsorbed from TB onto the Fb networks forming assemblies 2,3, and 4, respectively. Fb network with incorporated CO I (assembly 5) was prepared from TB solution containing 200 µg/ml of Fbg and 100 µg/ml of CO I.

Vascular smooth muscle cells (VSMC) were derived from the thoracic aorta of 8-week-old male Wistar SPF rats by explantation method (Bačáková and Kuneš 1995), and used in passage 5. Cells were seeded at the initial number of 30 000 cells/well (i.e., population density of about 18000 cells/cm²) into 1.5 ml of Dulbecco-modified Eagle medium (DMEM; Sigma, U.S.A.), supplemented with 10% of fetal bovine serum (Biomedica, Czech Republic) and 40 µg/ml of gentamicin (LEK, Ljubljana, Slovenia).

The number of initially adhered and spread VSMC, as well as the size of cell spreading area, were evaluated 24 hours after seeding using either native living cultures or fixed samples stained with Gill's hematoxylin and eosin (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.). Cells were counted on 4 samples (in total on 31-49 randomly selected fields of 0.14 mm², phase-contrast microscope Olympus, Japan, objective 20x). The size of cell spreading area was measured on microphotographs taken by a digital camera (Olympus, DP70, Japan) using a software Atlas (Tescan, Czech Rep.) in 20-26 microscopic fields for each sample (121-176 cells, objective 20x, 0.14 mm²). On day 3 after seeding, 4 samples of each type (in total 54-66 microscopic fields) were used for counting of cell number. On day 7 after seeding, cells on four samples of each type were counted by Coulter Particle Counter (Coulter Electronics Ltd., Florida, U.S.A.). Bromodeoxyuridine (BrdU) labelling index, i.e. a marker of cell proliferation, was measured in cells three days after seeding. After 40 min incubation of cells with BrdU added to the culture media (final concentration 4x10⁻⁵ M), the BrdU incorporated into newly synthesized DNA was visualized using immunoperoxidase method (monoclonal antibody against 5-BrdU, EXBIO Prague, Czech Rep., dilution 1:200). Stained cells were counted in 15-16 randomly selected microscopic fields (0.14 mm², objective 20x).

Immunofluorescence staining of vinculin, a protein of focal adhesion plaques, and α -actin, a contractile protein and marker of VSMC differentiation, was performed in 4-day-old cultures. The cells were fixed in methanol (5 min, -20°C), pretreated with 3% foetal bovine serum in PBS containing 0.1% Triton X-100 solution (20 min at room temperature). As primary antibodies, mouse monoclonal anti-human vinculin antibody (dilution 1:100, Sigma, U.S.A.) and mouse monoclonal anti- α -smooth muscle actin, clone 1A4 (dilution 1:200, Sigma, U.S.A.) were used for incubation overnight at 4°C. As a secondary antibody, goat anti-mouse IgG fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (1:200, Sigma, U.S.A.) was applied for 1 hour at room temperature. Digital microphotographs of cells were taken under inverted epifluorescence microscope (Olympus, Japan) by a digital camera (Olympus, DP70, Japan), 20x objective.

Quantitative data were given as means \pm SEM and statistically evaluated by Student's t-test for unpaired data, using a 5% error probability criterion.

Results and discussion

In comparison with the unmodified polystyrene, all protein assemblies significantly improved the VSMC spreading. On day 1 after seeding, the largest cell adhesion area was achieved on fibrin coated with fibronectin, whereas the lowest spreading was found on the pure or laminin-coated fibrin net (FIG.1 and 2A). Interestingly, on the latter sample (i.e., PS-Fb/La), the small cell spreading area was associated with star-like shape of cells, characterized by multiple thin, long and branched protrusions and resembling the morphology of neurons, whereas the well-spread cells on fibronectin-coated fibrin were of polygonal shape typical for cultured VSMC (FIG.1B, C). However, during the degradation of fibrin, which lasted from several hours to about three days, the cells changed gradually their star-like morphology to the standard polygonal shape (FIG.1A, B, D). Laminin or collagen films, deposited on fibrin net, reduced the rate of fibrin degradation, thus the star-like morphology was most persistent on these samples (FIG.1C, E).

The size of cell spreading area is an important marker of cell adhesion and markedly influences the following cell proliferation, differentiation, motility and other cell functions (for review see Bačáková et al 2004). In addition, the fibrin network used in this study represented, at least partly, a 3D system, which has been reported to have an important influence on the morphology and behaviour of cells. For example, 3D collagen matrices supported the differentiation and development of specialized functions in endothelial cells, e.g. vasculogenesis (Davis et al. 2002).

The largest cell spreading area on fibronectin-coated fibrin was accompanied by a relatively high number of initially adhered cells on day 1, although the highest cell number was reached on fibrin nets coated with collagen I. Conversely, the lowest cell number was found on the unmodified polystyrene, i.e. the sample with the smallest cell adhesion area (FIG.2B).

Similarly on day 3 after seeding, the cell population densities were also higher on the protein assemblies than on the pure PS surface, namely by 39, 65, 43, 91 and 63% on PS-Fb, PS-Fb/FN, PS-Fb/La, PS-Fb/CO I and PS-(Fb+CO I), respectively. Surprisingly, on the pure PS, the number of BrdU-labeled cells, i.e. cells synthesizing DNA, was similar or even higher in comparison with that on the protein assemblies, which supports the idea that the cells are more active in proliferation at the intermediate rather than at the highest extent of adhesion (for review see Bačáková et al 2004). Relatively high BrdU labelling index was also found in cells on the pure fibrin net, i.e. another sample with relatively low initial cell adhesion and spreading. As a result, the cells on the latter sample reached the highest final population density on day 7 after seeding (FIG.2C). On the other hand, the DNA synthesis was the lowest on the fibrin coated with laminin, also characterized by a low initial cell adhesion, which indicated that the extent of initial cell adhesion is not the only factors controlling the subsequent cell growth (FIG.2D).

Immunofluorescence staining of vinculin performed on day 4 after cell seeding showed that dot-like focal adhesion plaques, i.e. the sites on cell membrane in which the adhesion receptors bind the ECM proteins, were visible in cells on all tested samples, especially on the pure fibrin and fibrin covered or mixed with collagen I. Finer and less detectable focal adhesions were observed in cells on fibrin coated with fibronectin or laminin as well as on the pure PS (FIG.3), i.e. on samples which showed the extreme values of the BrdU labeling index (i.e., the highest on Fn and PS, and the lowest on La). Immunofluorescence staining of α -actin re-

vealed that this contractile protein was present in all VSMC, but the distinct α -actin-containing microfilament bundles were apparent preferentially in cells of a large spreading area.

Conclusion

Protein assemblies composed from fibrin net coated with extracellular matrix proteins collagen I, fibronectin or laminin support and regulate the adhesion and proliferation of VSMC. These layers are promising for surface modifications of artificial materials developed for tissue engineering, such as construction of bioartificial vascular prostheses.

Acknowledgement

This research was supported by the Grant Agency of the Acad. Sci CR under contracts No. IAA4050202 and IAA400500507. We also thank to Dr. Věra Lisá and Mrs. Ivana Zajanová for their excellent technical assistance in cell culturing and immunocytochemical staining.

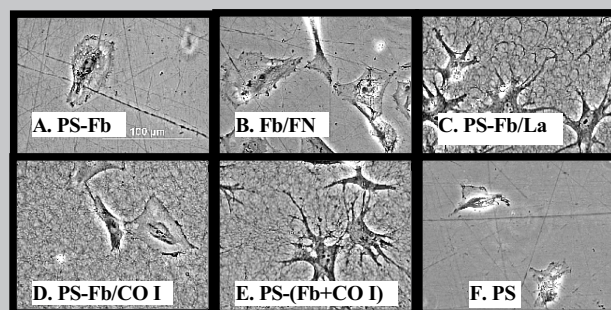


FIG. 1. Morphology of VSMC on thin fibrin nets coated with different protein layers (see the Material and Methods) on day 1 after seeding. Living cultures, inversion microscope Olympus, Japan, obj. 20x. PS: polystyrene, Fb: fibrinogen, FN: fibronectin, La: laminin, CO I: collagen I.

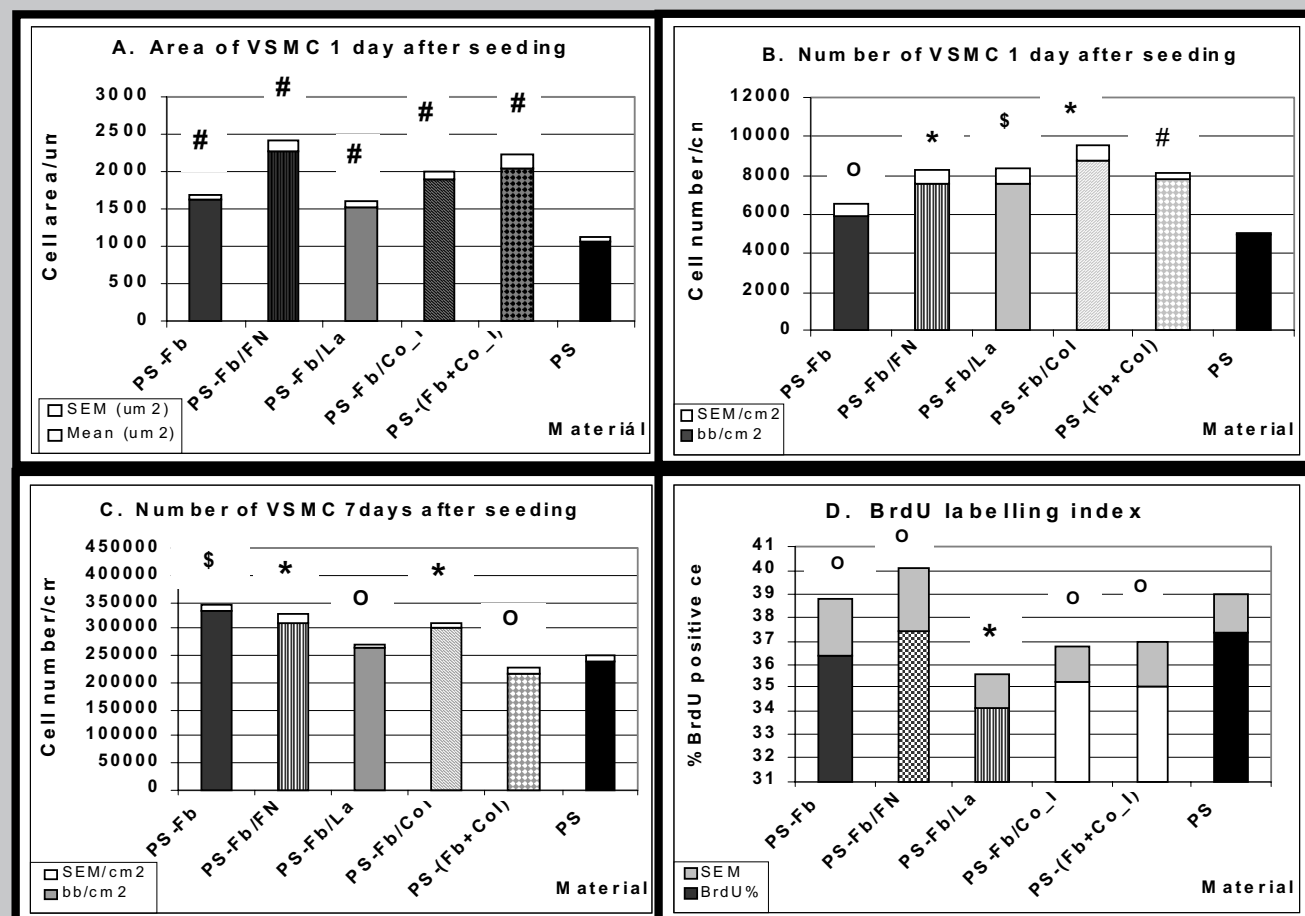


FIG. 2. Spreading area of VSMC 24 hours after seeding (A), cell number 24 hours (B) and 7 days (C) after seeding and BrdU labelling index 3 days after seeding (D) on different protein assemblies (see the Material and Methods). Mean \pm SEM, statistical significance: * $p < 0.01$, \$ $p < 0.02$, # $p < 0.001$, O = n.s. in comparison with the values on PS. PS: polystyrene, Fb: fibrinogen, FN: fibronectin, La: laminin, CO I: collagen I.

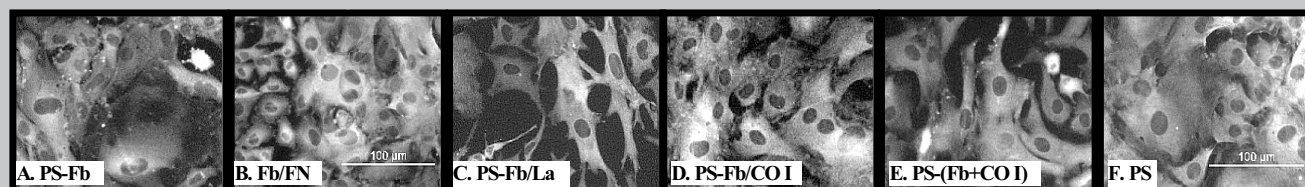


Fig. 3. Immunofluorescence staining of vinculin in VSMC on day 4 after seeding on different protein assemblies (see the Material and Methods). Olympus inversion microscope, obj. 20x. PS: polystyrene, Fb: fibrinogen, FN: fibronectin, La: laminin, CO I: collagen I. Arrows indicate focal adhesion plaques.

- [1]. Bačáková L., Kuneš J.: *Physiol. Res.* 44: 127-130, 1995.
- [2]. Bačáková L., Walachová K., Švorčík V., Hnatowicz V., J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 12: 817-834, 2001.
- [3]. Bačáková L., Filová E., Rypáček F., Švorčík V., Starý V.: *Physiol. Res.* 53: Suppl 1: S35-45, 2004.
- [4]. Benoit D.S., Anseth K.S.: *Biomaterials.* 26: 5209-5220, 2005. (RGD, PHSRN)
- [5]. Brodie J.C., Goldie E., Connel G., Merry J., Grant M.H.: *J. Biomed. Mater. Res. A.* 73: 409-421, 2005.
- [6]. Davis G. E., Bayless K.J., Mavila A: *Anat. Rec.* 268: 252-275, 2002.
- [7]. Heitz J., Švorčík V., Bačáková L. K. Ročková K., Ratajová E., Gumpenberger T., Bäuerle D., B. Dvořánková B., H. Kahr B., Graz I., Romanin C.: *J. Biomed. Mater. Res. A.* 67: 130-137, 2003.

• • • • •

EXTRA-CELLULAR MATRICES FOR TITANIUM IMPLANTS

T. DOUGLAS*, U. HEMPEL**, S. BIERBAUM¹, D. SCHARNWEBER*, H. WORCH*

*MAX BERGMANN CENTER OF BIOMATERIALS, RESEARCH GROUP BIOMATERIALS, BUDAPESTER STRASSE 27, 01069 DRESDEN, GERMANY

TIMOTHY.DOUGLAS@MAILBOX.TU-DRESDEN.DE

**CENTRE OF THEORETICAL MEDICINE, INSTITUTE OF PHYSIOLOGICAL CHEMISTRY, FIEDLERSTRASSE 42, 01307 DRESDEN, GERMANY

[*Engineering of Biomaterials*, 47,(2005),12-13]

Introduction and methods

The success of titanium implants for bone contact is dependent on integration with the surrounding bone tissue, which demands suitable implant surface modification. One approach is the biomimicry of the natural bone extra-cellular matrix (ECM) by coating the implant surface with collagen fibrils, which present binding sites for integrins and are not desorbed when placed in solution. Collagen fibrils can serve as a ground matrix, enabling the inclusion of glycosaminoglycans (GAGs) and proteoglycans (PGs) which naturally occur in bone, such as Chondroitin Sulphate (CS), which has been shown to stimulate cell bioactivity in vivo [1], and Decorin. CS and Decorin may be immobilised in collagen fibrils during fibril formation in an appropriate phosphate buffer solution. Synergic effects with growth factors, which can retain their biological activity on collagen, are also possible [2] [3] [4].

In middle ear surgery, adequate mechanical fixation of titanium prostheses to the stapes footplate has not been achieved. Loading an implant whose surface has previously been coated with GAG/PG-containing collagen fibrils with osseointegrative growth factors may result in fixation through osseointegration. The aims of this work are the characterisation of CS- and Decorin-containing fibrils of the collagen types I, II and III for use as coatings, as well as the reaction of primary osteoblasts from human stapes on titanium surfaces coated with these fibrils, both crosslinked and non-crosslinked, in order to select the most suitable coating for animal experiments. The amount of immobilised CS and Decorin in dependence of the ionic strength of the fibrillogenesis buffer was quantified. CS and Decorin were biotinylated and their bioavailability and desorption studied by ELISA. Primary human osteoblasts were obtained from donated human stapes in tissue culture, expanded and

plated onto titanium surfaces coated with collagen fibrils. Cellular reactions were investigated with respect to proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity and expression of osteoblastic markers.

Results and discussion

CS/Decorin assays [5], [6] demonstrated the dependence of amount bound per mass unit of fibrils on collagen type and the ionic strength of the fibrillogenesis buffer. Collagen II bound significantly more CS and Decorin than Collagen I and III at both high and low ionic strengths. At high ionic strength a limit for the incorporation of Decorin in Collagen I was reached. Detection of desorbed biotinylated CS and Decorin in phosphate-buffered saline by ELISA showed differences in the desorption profiles of CS and Decorin. Direct ELISA on surfaces coated with fibrils containing biotinylated CS and Decorin showed that both are bioavailable for interactions at the surface.

Osteoblasts from human stapes footplates showed slight differences in proliferation, ALP-activity and expression of osteoblastic markers, depending on the presence of CS or Decorin, the collagen type, and whether crosslinking had been performed. The choice of collagen type appears to have more influence than the presence of Decorin.

Summary

At low buffer ionic strength a higher amount of Decorin and CS is immobilised in fibrils of collagen I, II and III. Collagen type II can bind more CS and Decorin than types I and III. Desorption profiles of CS and Decorin are different. This may affect the release kinetics of growth factors. Primary stapes footplate osteoblast behaviour appears to be influenced by collagen type, crosslinking and presence of CS or Decorin.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Bundesministerium für Bildung und Forschung (German Federal Ministry of Education and Research) for their financial support.

References

- [1] van Susante J et al., *Biomaterials* 22, (200), 2359-2369, 32634-32638.
- [2] Fischer U et al., *Biomaterials* 24, (2003), 2632-2641.
- [3] Takeuchi Y et al., *J Biol Chem.* 269(51), (1994), 32634-32638

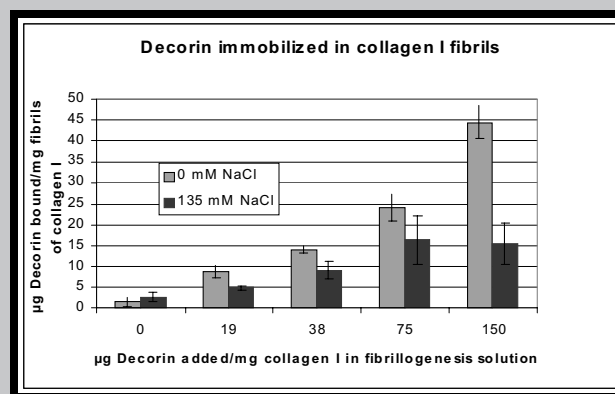
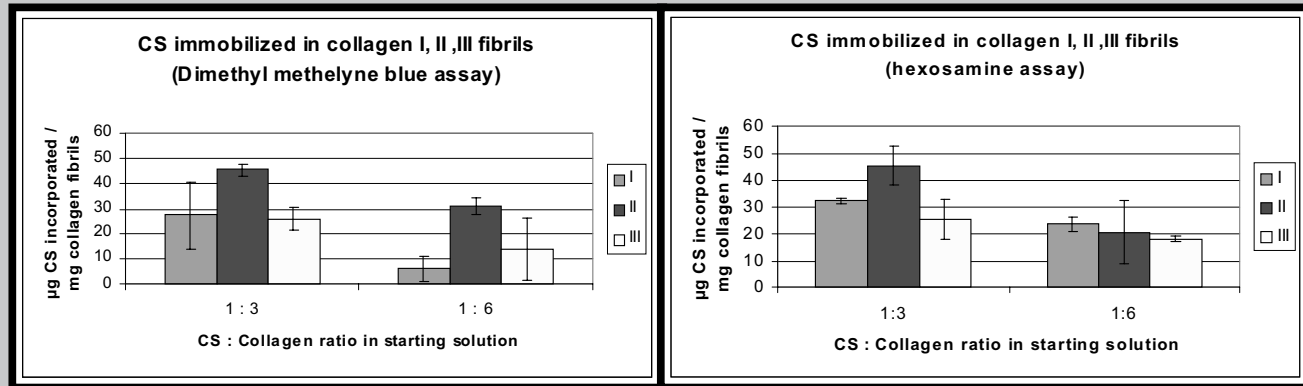


Diagram: Decorin-binding ability of collagen type I fibrils at low (blue) and high (red) buffer ionic strengths. Increase in ionic strength is achieved by addition of 135 mM NaCl to buffer.



Diagrams: CS-binding ability of fibrils of collagen types I (purple), II (red) and III (yellow) measured by Dimethyl methylene blue assay (left), and hexosamine assay (right).

- [4] Kuschert G. et al., *Biochemistry* 38, (1999), 12959-12968.
 [5] Daamen W. et al., *Biomaterials* 24, (2003), 4001-4009.
 [6] Janusz M. et al., *Osteoarthritis Cartilage* 12(9), (2004), 720-8.

METHOD OF MODEL FORMATION OF TRAUMATIC OSTEOMYELITIS OF MANDIBLE IN EXPERIMENT

A.Z. BARMUTZKAYA, I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA

BELORUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, BELARUSSIAN
 COLLABORATING CENTER OF EACMFS

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53, (2005), 13-14]

Last years cranio-maxillofacial injuries became more frequent, so the quantity of traumatic fractures of mandible is increased and is changed from 67,4% to 85% in dependence of country region, social status of the population. Regardless of the wide application of the modern treatment of the mentioned above pathology, the level of inflammatory complications stay high at the range from 2% to 12%. Last time the character of inflammatory processes has changed. Hard forms of purulent infections on different anatomic areas are frequently met. Traumatic osteomyelitis treatment is a complex problem which demands great attention to it and is to be permanently improved. Adoption of modern methods of treatment and rehabilitation in clinic is to be studied in advance. According to the special literature resources there is no common opinion what animal is to be chosen for experimental studying. In majority of cases rabbits are subjected for experiments. But this model is not quite satisfactory because it is possible to re-create the line of fracture on that area of mandible where the teeth are missing. Taking into consideration that fact in complex with properties of immunological processes for this kind of animals we have found bone tissue regeneration of all experimental animals during 2 - 3 weeks. That is why last years they have taken a dog as a model for bone tissue regeneration experiment after traumatic fractures and while complications [1, 3, 5, 6, 7, 8, 9]. There is no doubt that immunological status of a dog is different from human one. But denture description, mandible structure, local factors of the oral cavity allow to approximate the experimental model conditions to the clinic situation at the most.

Aim of the research

is to create experimental model of mandible traumatic osteomyelitis when a dog is used as a laboratory animal.

Materials and methods

Experiment was performed on 22 watchdogs. All animals were at the age from 2 to 4 years old and there weight was 9 - 10 kgs. Operation has been done under intravenous anesthesia with Sol. Thiopentali-Natrium 10%, 40-45 mg per 1 kg of the animal weight. Using of that anesthesia treatment has permitted to make operations on mandible within 1,5 - 2 hours without additional anesthesia. They have inserted approximately 15 ml of Sol. Thiopentali-Natrium 10% while one operation procedure. That method gives to avoid complications during operation procedures as well as after it.

Operations have been performed in aseptic conditions. Incision has been made parallel in 1 sm to the edge of the mandible. Skeen was cut till the bone. After the periosteotomy and skeletization of horizontal part of mandible made by stomatological equipment, osteotomy has been performed under the angle of 80° - 90° in the region of 35 or 36 teeth. Nerves and capillaries have been cut and mucous membrane of alveolar appendix has been damaged. Fangs in the line of fracture have not been extracted. After that osteosynthesis by dynamic compression plating has been done. The wound was cultivated with 5 ml of Sol. Lincomicini 30%. Layer by layer, they have put stitches in a wound by superamide. Stitches were cultivated by Sol. Iodi Spirituosae 5%. Postoperatively animals had mechanically hard diet (habitual one for this kind of animals).

We succeeded to take traumatic osteomyelitis in 100% of cases of examined animals experimentally with model clinical descriptions: presence of sinus tract with suppuration, granulation tissue, mobility of mandible parts, presence of big dimensions sequestration with granulation tissue between tissue fragments.

That method of model formation of traumatic osteomyelitis of mandible in experiment is different from known models and has the following advantages:

- 1) It is easy for application. There is no necessity for additional medical equipment and medicines use.
 - 2) It allows creating the model in short terms.
- Also, when formatting the model the same etiological agents of complications for traumatic fractures as for clinical conditions were taken into account. Namely:
1. Damage of bone integrity
 2. Factor of bone wound infection
 3. Trophism and blood flow stopping in the region of the line of fracture
 4. Presence of fangs in the line of fracture

Conclusion

Research results allow to advise mentioned above method and model of traumatic osteomyelitis formation of mandible for application in experimental studying of different methods and ways effectiveness for treatment and rehabilitation procedures of that pathology.

References

- [1] Barnutzkaya A.Z. Compressive and compressive-remote method of osteosynthesis in complicated mandible fractures treatment : Abstracts of theses. ... cand. of med. scien: 14.00.21 /Leningr. state inst. doct. improv. nmd. S.M.Kirov.- L., 1988. - 22p.
- [2] Bermadskiy Y.I. Traumatology and reconstructive cranio-maxillofacial surgery. *Meditsinskay literature*, (1999). 456.
- [3] Lastovka A.S. Closed injuries of the big salivary glands in traumatic fractures of mandible, diagnostics and treatment: Abstracts of theses. ... cand. of med. scien: 14.00.21 /Min. st. med. inst.- Mn., 1990.- 16 p.
- [4] Lukyanenko V.I. About some questions of pathology, prophylaxis and treatment of traumatic osteomyelitis of mandible of the non limited origin, *Mather. to 11nd Intern Congr. of stomatologist*. (1970), 111 - 117.
- [5] Mironovitch S.I. Influence of the combined trauma on the regeneration of the face skeleton bone fractures: Abstracts of theses. ... cand. of med. scien: 14.00.21 /Min. st. med. inst.- Mn., 1999.- 16 p.
- [6] Nakonechniy V.V. High energy laser in complex treatment of patients with chronic traumatic osteomyelitis of mandible in conditions of compressive osteosynthesis: Abstracts of theses. ... cand. of med. scien: 14.00.21 /Kaliningr. state med. inst.- Kalinin, 1989.- 18 p.
- [7] Perova M.D., Kozlov V.A. Treatment of the bone defects formatted near of the implants with application of non-resorbated microcellular membrane barrier. P.2. Clinico-morphological issue, *Parodontics*, 12, 3, (1999), 21 - 27.
- [8] Pohodenko-Chudakova I.O. Methods of experimental models making to study stimulation of regeneration process of mandible bone tissue, *Inzynieria biomaterialow (Engineering of biomaterials)* 37, (2004), 11 - 12.
- [9] Tchudakov O.P., Barnutzkaya A.Z. Complex fractures of mandible, modern principles of diagnostics and treatment //Organization, prophylaxis and rehabilitation in stomatology: Theses. Of report of stomatologists BSSR. Mn., 1987.- P. 104 - 105.

tioning balance of parasympathetic and sympathetic nervous systems, return to normal organism homeostasis and oral cavity indexes providing optimal correlation of dental enamel dynamic balance - oral fluid. One of the most effective methods corresponding to the mentioned requirements is reflexotherapy.

Aim of this research

is to analyze and appreciate caries prophylactic effects by laser acupuncture needle on the base of clinical tests.

Materials and methods

In our experiment 253 persons 15 - 25 years old were involved. They were divided into two groups. Caries, teeth stopping, extracted teeth index was equal to zero for the patients of the 1-st group composed of 27 persons. It was group of control. Acupuncture stimulation was performed by laser acupuncture needle (patent No 924) for the patients of the 2-nd group composed of 185 persons. No additional prophylactic treatment was applied for them. Every group was divided into three subgroups according to the caries intensity level (CIL): A - low CIL, B - middle CIL, C - high CIL.

For laser acupuncture stimulation the following classic meridians situated in the maxillofacial area were chosen: GJ, E, IG, VB. To produce an acupuncture effects total and local acupuncture points (AP) of above-mentioned meridians situated on the face, frontal part of neck in the region of skin projection of salivary glands and nerves responsible for AP innervation were used [2, 6]. The course of laser acupuncture treatment included 10 sessions with daily or in a day exposure was applied. Indexes of caries increasing and caries increasing reduction, data of structure and functional resistance of enamel (SFRE) by V.R.Okushko, L.I.Kosareva, I.K.Luckaya (1982) [5] method were used to appreciate caries prophylactic effects. Those indexes were examined four times for the patients of 1-st and 2-nd groups. First examination was performed when patient saw the doctor for the first time; second examination - in a month after the first visit to the doctor (for the patients of the 1-st group) and in a month after laser acupuncture stimulation course (for the patients of 2-nd group); 3-rd and 4-th examinations had place one and two years later correspondingly.

Results

Detailed results analyses confirmed that increased SFRE index of the 1-st group patients was for certain higher than control level ($p < 0,001$) while the hole period of examination. Regarding to the initial indexes authentic results increasing was fixed in subgroup A while 7-th examination ($p < 0,01$), in subgroup B - while 3-rd examination ($p < 0,05$), in subgroup C - while 4-th examination ($p < 0,001$). At the 2-nd group SFRE index in subgroup A had not authentic difference from control level beginning from the second examination. It means SFRE index reached the level of the norm. In subgroup B the same result was fixed beginning from the 3-rd examination. In subgroup C authentic difference with control indexes was marked ($p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,02$; $p < 0,01$) correspondingly to the numbers of examinations.

Difference from results of initial indexes were marked in all of subgroups while examinations.

It is necessary to say caries process increasing was progressively reducing in the 2-nd group while all of examina-

CARIES DISEASES PREVENTION BY LASER ACUPUNCTURE NEEDLE

I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA

BELORUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY,
BELARUSSIAN COLLABORATING CENTER OF EACMFS

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),14-15]

While many years dental caries stays one of the general problem of stomatology [1,3,4,7,8,9]. Elaboration of new modes and methods of its prophylaxis and treatment is a global task for the specialists of the world. Caries is provoked by different local and total factors. That is why it is practically evident prophylactic treatment of this disease should be complex and applied procedures should have many-sided mechanisms of acting which could level func-

tions in all subgroups. In subgroup A this index composed 92,89% while the 2-nd examination, 81,36% - while 3-rd examination, 68,06% - while 4-th examination; in subgroup B it is 116,50%, 87,37%, 73,96%; in subgroup C - 84,95%, 80,86%, 77,99% correspondingly.

Reduction of caries increasing in subgroups A and B composed 31,94% and 26,04% correspondingly.

Conclusion

Results of all made examinations proved that offered method of treatment and prophylaxis with laser acupuncture needle is effective for the patients with low and middle level caries intensity while a big period of time (2 years).

References

- [1] Carlos J.P. Researche on dental caries - the 1970's and beyond, *Dtsch. Zahnaerztl. Ztschr.* of the research, 37, 1, (1970), 56 - 63.
- [2] Chen Jing. Anatomical atlas of chinese acupuncture points.- Jinan, China: Shandong science and technology press.- 1990.- 266 p.
- [3] Konig K.G. Caries and heredity, *Ned. Tijdschr. Tandheelkd.*, 102, 1. (1995), 18 - 20.
- [4] Leus P.A. Clinico-experimental examination of pathogenesis and pathogenetic therapy and prophylaxis of caries: Abstr. ... dr. med. scien: 14.00.21 /Mosc. stomat inst. named N.A.Semashko.- 1977.- 30 p.
- [5] Okushko V.R., Kossareva L.I., Lutskaia I.K. Clinical groups of patients selection according to the level of teeth defects by caries: Information letter.- Kiev, 1982.- 2 p.
- [6] Pohodenko-Chudakova I.O., Chudakov O.P. Instructions for traditional and modern ways and methods of acupuncture influence while cranio-maxillofacial diseases /Under red. T.N.Chudakovoy.- Mn.: Assobniy Dah, 2004.- 352 p.
- [7] Pohomov G.N. Dental caries and its prophylaxis.- Riga: Zinatne, 1976.- 128 p.
- [8] Sayfulina H.M. Dental caries of children and young people: School-book.- M: Medpress-inform, 2001.- 96 p.
- [9] Stookey George K. Current Status of Caries Prevention, *J. Compendium of Continuing Education in Dentistry*..20,10 A, (2000), 862 - 868.

STUDY OF THE PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF BIOMATERIAL COMPOSITES USED IN MIXED CROWNS

ANDRADA POPOVICI*, DORIN BORZEA*, ANGELA POP*,
ALEXANDRA ROMAN*, OVIDIU PASTRAV*,
MARIOARA MOLDOVAN**, CRISTINA PREJMEREAN**

*"IULIU HATIEGANU" UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY,
E.ISAAC 13, CLUJ-NAPOCA, ROMANIA, ANDRAPPOVICI@YAHOO.COM

**"RALUCA RIPAN" INSTITUTE FOR RESEARCH IN CHEMISTRY,
FANTANELE 30, CLUJ-NAPOCA, ROMANIA

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),15-16]

Introduction

Any mixed crown has to restore the structure of dental arches in order to permit their masticatory, occlusal and esthetics functions. The development of new biomaterial

composites allows to create mixed crowns with superior esthetics and resistance than the acrylic crowns [1-4]. These composites use double or triple polymerisation, completed with thermo- and baropolymerisation. The adhesion of composites to metal is based on mechanical macroretentions in the metallic part or on microretention obtained by electrolytic etching or sandblasting. The use of new adhesive techniques and the development of the computer-generated restorations and crowns determine the increase of quality demands for biomaterial composites used in fixed prosthodontics.

Purpose

The purpose of this study is to evaluate physical and mechanical properties such as flexural strength, compressive strength, diametric tensile strength or water absorption (in accordance with ISO 4049-Resin-based filling materials) as well as the metal adhesion of physiognomical component of the mixed crowns.

Materials and methods

The organic phase consists mainly of Bis-GMA (60%), TEGDMA (30%) and UDMA(10%); Additionally, CQ (0.5%), DMAEM(1%) and BHT polymerisation inhibitor are added. The inorganic phase is based on six vitreous masses (noted G1, G2, G3, G4, G5 and G6) prepared by the conventional melting method. The chemical composition and the synthesis conditions of glass samples are shown in TABLE 1. The chemical bond between the organic and inorganic phases was provided by silanisation of fillers from an acidulated ethanol-water with 3-methacryloyloxypropyl-1-trimethoxysilane (A-174). The composites were prepared as a paste, by dispersing the synthesized fillers in the organic phase. The hardening of the pasta was performed through exposition to visible light in the range of 400-500 nm, for 40 seconds, using a dental lamp (e.g. 3M). After the initial hardening, the biocomposite was subdued to a baro-thermic treatment at 135°C temperature and 60 psi pressure, for 20 minutes. The compositions of the light-curing composite resins are shown in TABLE 2.

Results

Characterization biomaterials composites

The values for the mechanical properties determined for the biomaterial composites after light-curing (CM7 sample), respectively after light-curing and baro-thermic treatment (CM1, CM2, CM3, CM4, CM5, CM6 samples) are shown in FIG.1. The tests for the mechanical properties such as compressive strength (CS), diametral tensile strength (DTS) and flexural strength (FS) were performed with an universal mechanical testing instrument, INSTRONE (VEB Thüringner Industrie Werk Rauenstein Company).

Determination of the water absorption.

Water sorption was measured on composite disks ($\Phi=20,00\pm0.1$ mm; $h=1.00\pm0.05$ mm) and stored under distilled water at 37°C for 7 days (FIG.2).

Determination of the composite-metal adhesion through thermal treatment alternative

The test was performed on 50 samples from each composite resin and expressed in per cent values (TABLE 3).

class	leptin egimix hx°C	SiO ₂	ZrO ₂	SrO	ZnO	BaO	Al ₂ O ₃	CaO	Na ₂ O	CaF ₂	B ₂ O ₃	P ₂ O ₅
G1	0x12E	30	-	-	15	0.4	30	10	5	9.6	-	-
G2	0x11E	43	-	-	5	-	10	11	9	15	-	7
G3	0x14C	50	20	-	-	-	10	5	10	5	-	-
G4	0x13E	40	-	-	30	-	5	10	5	-	10	-
G5	0x13C	40	8	30	-	-	5	12	-	5	-	-
G6	5x12E	40	-	-	-	30	10	5	-	5	5	5

TABLE 1. The chemical composition [wt %] and the melting regime (time x temperature) of glasses

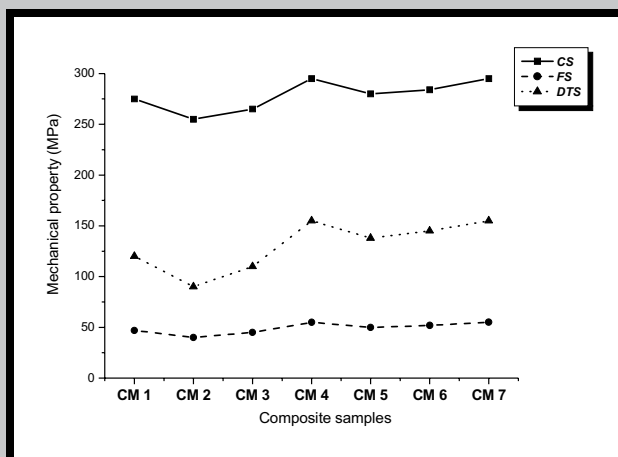


FIG. 1. The compressive strength (CS), diametral tensile strength (DTS) and flexural strength (FS) values for the composites samples.

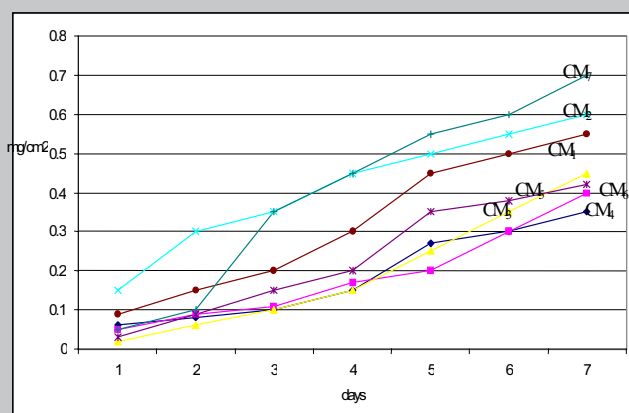


FIG. 2. The water absorption values for composites samples.

Conclusions

The results of the determinations for the physiognomic component of the mixed crowns were analysed in comparison with the control sample, hardened only through photochemical initiation (CM7). The highest mechanical strength values (CS, FS, DTS) were obtained for the baro-thermophotopolymerized CM4 composite. The water sorption test indirectly illustrates that the interfacial bonds of the organic filler are not damaged; the water sorption values are situated between 0.3 and 0.7 mg/cm² for CM4 and CM7 composites. The results of the metal-composite adhesion using Silicoater MD as conditioning system show that the CM4 composite is recommended for the mixed crowns with optimal strength in time. Taking into consideration the mechanical properties and the water sorption value of the postcured composite CM4, this one was proposed for further investigations such as toxicological and clinical tests in

order to be used as physiognomic component of the metallo-polymeric prostheses.

Paste	G1	G2	G3	G4	G5	G6	Quartz
CM1	60						40
CM2		60					40
CM3			60				40
CM4				60			40
CM5					60		40
CM6						60	40
CM7		50					50

TABLE 2. The composition of the inorganic filler for light-curing composite resins [wt%].

Conditioning system	Composites						
	CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6	CM7
Silicoater MD	20 %	18 %	10 %	0 %	10 %	14 %	40 %

TABLE 3. Adhesion through thermal treatment alternative.

References

- [1] J.M.Antonucci, B.O.Fowler, S.Venz, *Dent Mater*, 7, (1991), 124.
- [2] R.L.Bowen, F.C.Eichmiller, W.A.Marjenhoff, *J Am Dent Assoc*, 122, (1999), 71.
- [3] K.Li Edwards, A.F.Yee, *J Dent Res.*, 72(Spec Iss), (1993), 113.
- [4] K.J Söderholm, *J Dent Res.*, 60, (1981), 1867.

BIOMATERIALS BASED ON POLYSILOXANES AND GLASS FIBERS

T.SUCHY*, **K.BALIK**, M. SOCHOR*, M.CERNY**, R.SEDLACEK*, V.PESAKOVA**, H.HULEJOVA**

*CTU IN PRAGUE, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, DEPARTMENT OF MECHANICS, CZECH REPUBLIC

**INSTITUTE OF ROCK STRUCTURE AND MECHANICS, ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC, PRAGUE, CR

***INSTITUTE OF RHEUMATISM, PRAGUE, CR

LABORATORY OF HUMAN BIOMECHANICS, CTU IN PRAGUE, FAC. OF MECHANICAL ENG. DEPT. OF MECHANICS, TECHNICKA 4, 166 07, PRAGUE 6, CZECH REPUBLIC

SUCHYT@BIOMED.FSID.CVUT.CZ

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),16-18]

Introduction

The aim of our study is to design and to produce biomaterial with mechanical and biocompatible properties that should approach as much as possible the properties of the human bone, the strength characteristics should be at least the same and the modulus of elasticity should be close to the value characterizing the human bone. It should have a sufficient porosity, to enhance a bone growth. However, by the biocompatibility is meant now not only a passive biocompatibility or an inertness that is the facilitation of the growth of the tissue around the implant without any signs of toxicity but especially the bioactivity, i. e. the assurance of a

specific biological response on the interface of the material, resulting in the formation of a solid bond between the material and the tissue. In this respect we have designed methodology for composite surface modification (see FIG.1), prepared samples with different open porosity and studied its biological response on the interface between implants and bone tissue [1,2].

Materials and methods

The LUKOSIL 901 (L901) siloxane precursors and LUKOSIL M130 (M130) resins (commercial products of Lucebni zavody Kolín, Czech Republic) were used. The composites were prepared from plain-woven cloth V240 (E-glass, VETROTEX, Litomysl, Czech Republic), and from satin-woven fabric 21055 (R-glass, VETROTEX, Saint Gobain, France). The soaked prepreps were stacked, cured at 250°C, then cut to pieces of the required size, and cured/pyrolyzed at 200-350°C in nitrogen. The analysis of the properties of the glass composites tested represented the testing of three types of samples in the production of which various combinations of the basic precursors were used.

Mechanical properties

Mechanical properties of glass composites were obtained by three methods. Young's modulus (Eres.) and shear modulus (Gres.) in elasticity were measured by using the electrodynamic resonant frequency tester ERUDITE. By a four-point bending arrangement on the material tester INSPEKT were determined Young's modulus (E4p.b.) and the flexural strength (R_m). Young's modulus (Estr.) and limit stress values (Rstr.) were also determined on the material tester Mini Bionix (MTS Syst. Corp.), while applying compressive loading force and using strain gauges (HBM Wägetechnik, GMBH). See TABLE 1.

Biological properties

Materials	Vf	Rm	Eres.	E4p.b.	Estr.	Gres.	Rstr.
	[%]	[MPa]	[GPa]	[GPa]	[GPa]	[GPa]	[MPa]
E-glass + M130	51	200.81	25.38	23.70	32.26	2.39	80.39
E-glass + L901	52	195.75	27.70	25.70	27.3	2.77	119.9
R-glass + M130	65	97.9	16.20	12.22	14.54	5.79	52.95

TABLE 1. Mechanical properties of glass composites.

Biological properties were observed in tests - adherence, proliferation and metabolic activity of cells growing on the tested materials, and levels of inflammatory cytokines exprimed during the cultivation into the cell medium. The medium of this cultivation experiment was performed for cytokines TNF- α , IL-1 β detection using immuno-chemiluminescence method of the analyzer Immulite (DCP, Los Angeles, USA).

Analysis of surface structure influence

Based on previous tests we've chosen the composite material with a sufficient compromise between both mechanical and biological properties, R-glass+M130, and prepared samples with three different pores size, namely 250-500 μ m, 500-750 μ m, <750 μ m. Tests of interfacial bonding strength have been performed (Pull-off tests). These tests based on Nakamura's Method [3] (see FIG.2) have been

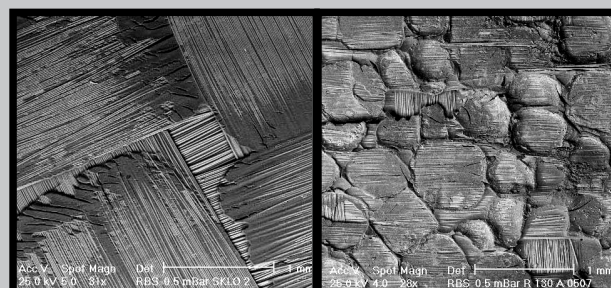


FIG. 1. Untreated /left/ and treated surface with pores dimension app. 500-750 nm.

performed to compare composite materials with different surface structure. The aim is to determine material with best "bone-friendly" surface and material with surface which is inert for bone ingrowth, i.e. to determine an influence of pore size and bone ingrowth. Another tests were performed by wettability testing of samples with different surface structure.

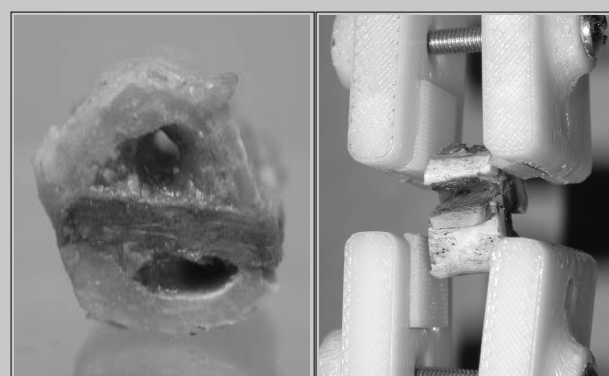


FIG. 2. A sample for Pull-off tests (rabbit bone with composite sample, 8 weeks after implantation).

Results

Based on these analyses we're able to select a material with sufficient mechanical and biological properties and inert surface for applications in the form of connective elements (e.g. bone plates for treatment of long bones) or material with sufficient mechanical and biological properties and open surface contributing to solid bond between implant and bone tissue for applications in the form of substitutive elements.

Conclusions and discussion

Composites based on glass fibers and siloxane resins promise to achieve good biomechanical properties while requiring a significantly lower cost. Pore-size dependence they can be potentially used in the form of connective, substitutive or filling elements.

Acknowledgements

This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic under the project No. 106/03/1167 and by the Ministry of Education project: Transdisciplinary research in Biomedical Engineering II., No. MSM 6840770012.

References

- [1] Williams P.L., Bannister C.H., Barry M.M., Collins P., Dyson M., Dussek J.E., Ferguson M.W.J., Gray's Anatomy, Churchill and Li-

.....

METHOD MODIFICATION FOR STUDYING OF ORAL FLUID MICRO-CRYSTALLIZATION FOR PATIENTS WITH PURULENT-INFLAMMATORY DISEASES IN CRANIO-MAXILLOFACIAL AREA

I.O. POHODENKO-CHUDAKOVA, Y.M. KAZAKOVA

BELARUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, BELARUSSIAN COLLABORATING CENTER OF EACMFS

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53, (2005), 18-19]

The test of oral fluid microcrystalization is well known and is widely used as additional method for diseases in cranio-maxillofacial area testing [1,3]. Many authors underlined its simplicity, objective character, reliability, repeatability and absolute innocence. The fact that this test has no recurrent, physiological or other restrictions is very important [2]. Oral fluid is one of the liquid mediums of human body. It provides homeostasis of organs characteristics and there compositions, tissues of the oral cavity [3]. In many literature sources it is mentioned that tissues of the oral cavity and oral fluid are in dynamic balance. So, pathological processes arising and developing in cranio-maxillofacial area can influence on the quantitative and qualitative data of the oral fluid. Many authors told about changes of that physical index of the natural biological medium of the oral cavity while diseases in cranio-maxillofacial area. But till now changes of the oral fluid microcrystalization while arising and developing of purulent and inflammatory diseases in cranio-maxillofacial area are not practically studied. In fact, there are no manuscripts about different morphological characteristics of crystalline rete of a drop of the oral fluid depending on nosology. Last time, the nature of purulent-inflammatory processes is changed. Hard forms of the purulent infections when it is sweeping on some anatomic areas are often met in very day practice, for example, complications as septicaemia, mediastinitis, septic, asphyksia and other [4]. During examination of the oral fluid microcrystalization for patients with purulent-inflammatory diseases in cranio-maxillofacial area and of changes of that physical index while treatment course, in the frame of the same samples of the oral fluid we have mentioned two types, in some cases - three types of the microcrystalization. Taking into consideration that this fact can have negative effects on the prognostics, diagnostics and finally on the treatment course, we had necessity to modify that test for patients testing with purulent-inflammatory diseases in cranio-maxillofacial area.

Aim of this work

is to modify the method of studying of the oral fluid microcrystalization and its application for patients with pu-

rent inflammatory diseases in cranio-maxillofacial area.

Materials and methods

We have examined 43 patients at the age of 16-36 years old with purulent-inflammatory diseases in cranio-maxillofacial area which passed the treatment course in the 2nd department of cranio-maxillofacial surgery in the hospital ? 9 of Minsk at the period from 1999 to 2005 years. According to the nosology and localization of the purulent-inflammatory processes, all patients were divided into two groups. I-st group (22 patients) was represented by patients with pterygoideus maddibularis. II-nd group (21 patients) was composed of patients with mylohyoideus area abscess. Group of control composed of 24 practically healthy people. While examination we have paid attention on the fact that total status of the patient and some aspects of the oral cavity could influence on the composition and properties of the oral fluid. All patients had no systemic diseases, injuries, operations which demand rehabilitation course in the past history. Pathology of the mucous tunic of the oral cavity was excluded. There was not found teeth anomalous position and jaw development, false teeth, amalgam temporary stopping were lacking. All patients had middle and high level of caries intensity. These patients correlation was equal. Methods by P.A.Leus (1977) [5] have been used to study prepared samples for microcrystalization examination of the oral fluid. Oral fluid was gathered in oral cavity by sterile pipette. After that three drops of the oral fluid have been put on a glass. Made samples of the oral fluid were dried with standard room temperature. After, they were examined under microscope with magnification of 10 which let see the content of the whole drop. Type of microcrystalization was established according to the indexes by L.A.Dubrovina (1988) [3]. As a result we have taken the pictures of the drops which we have met twice on the same glass. First type of microcrystalization was represented by long, prismatic, radial form crystals. Second type crystals were as isothermal ones, without clear orientation. Third type - separated, small, alone, non oriented crystals. In order to appreciate the received results we have divided every drop in four sectarians (I, II, III, IV). Also, we have determined the type of microcrystalization of the oral fluid for every sectarian and have calculated the arithmetic mean of the microcrystalization of every drop of the oral fluid by formula:

where:

$$M = \frac{a1 + a2 + a3 + a4}{4}$$

M - arithmetic mean of the microcrystalization of a drop of the oral fluid; a1, a2, a3, a4 - microcrystalization index of a sectarian of the oral fluid drop; 4 - quantity of the examined sectarians.

Arithmetic mean was calculated for three indexes in every sample. All data received while the experiment have been worked up on the PC "Pentium 4" in "Microsoft Excel".

Results and discussions

Examination results data received by method of microcrystalization study of the oral fluid by P.A.Leus showed all patients have three types of microcrystalization of the oral fluid. First type of microcrystalization have been determined for three persons (7% from the total number of examined patients), second type - for 11 persons (26%), third type - for 29 persons (67%). Microcrystalization types of the oral fluid are classified in the patients groups according

Patients groups	Type of oral fluids microcrystallization	Frequency
I-st group (pterygoideus mabidibularis)	I type	9,1%
	II type	27,3%
	III type	63,6%
II-nd group (mylohyoideus area abscess)	I type	4,8%
	II type	23,8%
	III type	71,4%

TABLE 1. Microcrystallization types of the oral fluid classified in the patients groups according to the nosology and localization of the purulent-inflammatory processes.

Patients groups	Average means of the microcrystallization data of the oral fluid	Frequency
I-st group (pterygoideus mabidibularis)	from 1 to 1,44	4,6%
	from 1,45 to 2,44	31,8%
	from 2,45 to 3	63,6%
II-nd group (mylohyoideus area abscess)	from 1 to 1,44	4,8%
	from 1,45 to 2,44	33,3%
	from 2,45 to 3	64,9%

TABLE 2. Average means of the microcrystallization data of the oral fluid in groups of patients according to the nosology and localization of the purulent-inflammatory processes of the cranio-maxillofacial area.

to the nosology and localization of the purulent-inflammatory processes (see TABLE 1). Average means of the microcrystallization data of the oral fluid in groups of patients according to the nosology and localization of the purulent-inflammatory processes and received while examination made by ourselves are classified in the TABLE 2. Authentic difference from the control data $2,12 \pm 0,13$ which made $p < 0,01$ for the patients of the I-st group and $p < 0,001$ for the patients of the II-nd group was found during examination in modification [5] of the data for both patients groups. When we used our own modification, difference with data of control made $p < 0,001$ for patients of the I-st and II-nd groups. Authentic difference was not found in both variants of examination when we have compared microcrystallization data of the oral fluid of the examined groups of patients. But clear tendency ($t=1,83$) was evident to the lowest degree crystals organization of the oral fluid for the patients of the II-nd group. Comparative appreciation of the microcrystallization data of the I-st and II-nd groups patients during different modifications of the examination showed the tendency to the authentic difference of the received data according to the results of the I-st group and significant difference $p < 0,05$ according to the received data of the II-nd group.

Conclusion

According to the mentioned above information we see more of authenticity and objectivity of our modification for microcrystallization examination of the oral fluid for patients with purulent inflammatory processes in cranio-maxillofacial area. It is to be used widely in practice medicine and research work.

References

- [1] Bondarik E.A., Gorodetskaya O.S., Belyassova L.V. Biochemical and biophysical indexes of the oral fluid for patients with high level of caries, *Bel. med. j.*, 10, (2004), 36-38.
- [2] Borovskiy E.V., Leotiev V.K. Oral cavity.- N.Novgorod: NGMA, 2001.- 304 p.
- [3] Dubrovina L.A. Microcrystallization of the mixed saliva for children with different intensity of the caries, *Stomatological help: Ann. Ad. /Under red. of Kadnikov G.I. et al.- Riga: RMI, (1988), 104-108*
- [4] Heymans. O., Lemaire V., Nelissen X. et al. Deep vein thrombosis in a burn patient, *Rev. Med. ,Liege*, 57, 9, (2002), 587-590.
- [5] Leus P.A. Clinico-experimental examination of pathogenesis and pathogenetic therapy and prophylaxis of caries: Abstr. ... dr. med. scien: 14.00.21 /Mosc. stomat inst. named N.A.Semashko.- M., 1977.- 30 p.

DEVELOPMENT OF NEW DESIGN OF THE ACETABULAR COMPONENT FOR TOTAL HIP REPLACEMENT

JAN SYKORA*, SVATAVA KONVICKOVA*, MATEJ DANIEL*

*LABORATORY OF HUMAN BIOMECHANICS, DEPARTMENT OF MECHANICS, CTU IN PRAGUE, CZECH REPUBLIC

**LABORATORY OF HUMAN BIOMECHANICS, CTU IN PRAGUE, FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, DEPARTMENT OF MECHANICS, TECHNICKA 4, 166 07, PRAGUE 6, CZECH REPUBLIC
J.SYKORA@SH.CVUT.CZ

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),19-20]

Introduction

As yet used total replacements of a hip joint take some negative events that influence endurance of total replacement. The aim our effort is evolution of a new design of an acetabular component of a total replacement of a hip joint that those negative events will minimize or eliminate in a better case. New shape of cup is symmetrical towards the hip joint stress. This cup was designed based on a mathematical models of a distribution of contact stress. We used finite element method for a verification of a new design of a hip cup. We compute with the finite element method distribution of the contact stress on the acetabular surface. We evaluate computed models based on results of the contact stress distribution on the acetabular surface and we have effort to achieve the most homogenous contact stress distribution and reduction of maximal value contact stress.

Materials and methods

We used mathematical models of a contact stress distribution [1,2,3,4] for a determination of a contact stress distribution with an indirect measuring. Three basic mathematical models of the contact stress distribution was derived. It was a mathematical model with uniform a contact stress distribution, a model with linear descent of a contact pressure in a plane perpendicular to a resultant hip joint force and a model with a cosinus distribution of a contact stress [5]. From these three basic models, the model with the cosinus contact stress distribution on the acetabular surface (FIG.1) was chose as suitable.

We compared the results of the contact stress distribution

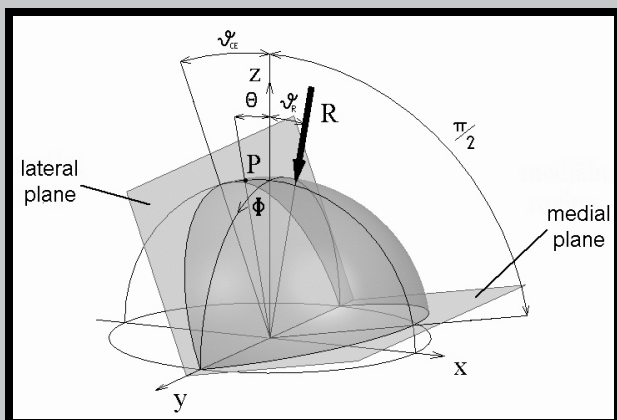


FIG.1. Mathematical model with cosinus distribution.

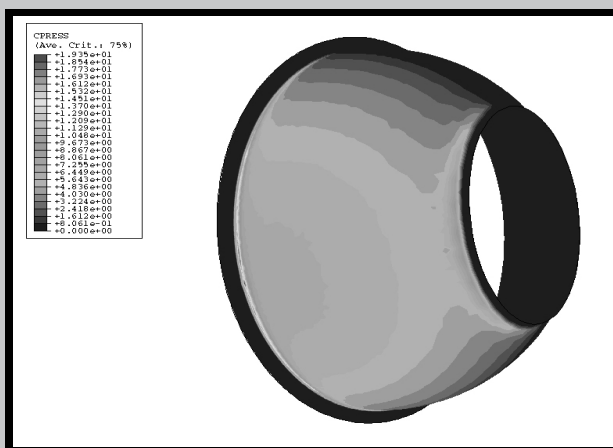


FIG.2. FEM model of the cup with hollow.

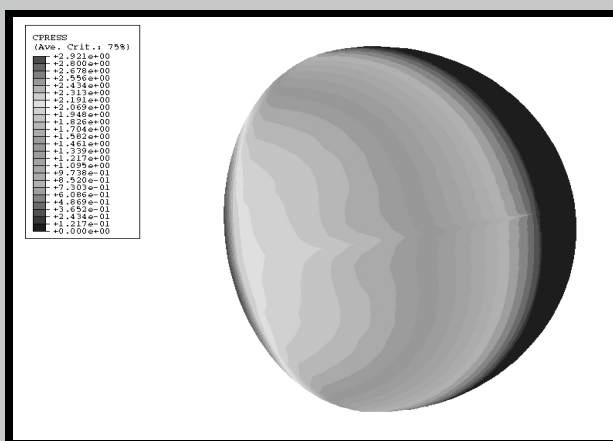


FIG.3. FEM model of the classic cup.

acquired from this mathematical model with the results of the numerical model from the finite element analysis of the contact stress distribution (FIG.3). From the comparison, we found out that both of them are very similar. We indicate on the basis of the comparison results, that it is possible to use the finite element method for the modeling of the non-weight bearing part of the total replacement of the hip joint.

The point of this technical solution of the new hip cup is to design such a shape of the joint surface that will be symmetrical towards the hip joint stress [6]. This shape is designed as the basic mathematical models of the distribution of the contact stress. Three basic forms of this shape was designed: a cup with a hollow, a tapered cup and a cup with a medial asymmetrical joint surface. The cup with the hollow was chose as the most suitable.

The finite element model of the cup with the hollow was

created based on known dimension. The hollow was situated near the non-weight bearing area of the hip joint and consistent with the mentioned condition that it was situated symmetrical towards the hip joint stress. A dimension of the hollow was optimized with calculations of few models.

Results

Finite element model of the cup with the hollow was computed as a contact job between an acetabular component of a hip joint and a femoral head. A resultant contact stress distribution is shown in FIG.2.

The contact stress distribution of the cup with the hollow is more uniform then the contact stress distribution of the basic hip cup. It is evidently from the comparison of the results of the contact stress distribution in the FIG.2 and the FIG.3.

Discussion and conclusion

We compared the mathematical model with cosinus contact stress distribution on the acetabular surface with the numerical model from the finite element analysis and indicated that it is possible to use the finite element method for the modeling the non-weight bearing part of the total replacement of the hip joint.

We chose the most suitable design of the hip cup. It is the cup with hollow. We created the finite element model of the cup with the hollow and we computed contact stress distribution for different dimensions of the hollow. The results from these models was compared with the model of the basic cup and we determined if the contact stress distribution is more uniform.

We achieved more uniform contact stress distribution form design of the non-weight bearing area of the hip joint.

A maximal value of the contact stress at the model cup with the hollow is greater. That was evoked with an extreme of the contact stress in a margin of this hollow. The extreme should be eliminated by a margin fillet.

Acknowledgement

The research is supported by the Ministry of Education project: Transdisciplinary research in Biomedical Engineering II., No. MSM 6840770012.

References

- [1] Iglič A., Kralj-Iglič V., Daniel M., Computer determination of contact stress distribution and size of weight bearing area in the human hip joint., Computer methods in biomechanics and biomedical engineering, 2002.
- [2] Daniel M., Gradient of contact stress as a parameter determining biomechanical status of human hip, Bratislava, 2001.
- [3] Legal H., Introduction to the biomechanics of the hip., Springer-Verlag, Berlin, 1976.
- [4] Pauwels F., Biomechanics of the normal and diseases hips., Springer-Verlag, Berlin, 1976.
- [5] Sýkora J., Matematické modelování kontaktních tlaků., Praha, 2004.
- [6] Daniel M., Sýkora J., Goldman T., Konvičková S., New design of the acetabular component for total hip replacement., Biomechanics of Man, Spicak, 2004.

FINITE ELEMENT ANALYSIS OF HUMAN HIP JOINT

JAN VRANA, ZDENEK HORAK, JIRI MICHALEC

CZECH TECHNICAL UNIVERSITY,
FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,
LABORATORY OF BIOMECHANICS
TECHNICKA 4 - PRAGUE 6, 16607, CZECH REPUBLIC
EMAIL: JANVRANA@BIOMED.FSID.CVUT.CZ

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),21-22]

Introduction

Understanding causes of arthritic disease beginning also depends on exact description and clear definition of mechanical properties of human articular cartilage. This project deals the mathematical modeling of biological tissues, the methodology and realization of experimental measurement of human hyaline cartilage is documented and carried out in vitro. The material characteristics of cartilage are presented on the basis of statistical analysis. The transversal isotropic material was chosen for its mathematical characterization and the constants E_i , G_{ij} , μ_{ij} ($i,j=1,2,3$) were determined in compliance matrix S_{ij} . These results were used for the finite element submodel of cartilage that was subsequently integrated into the entire model of the human hip joint.

Materials and methods

The specimens for measuring were prepared from the resection caput femoris, see FIG.1.

The donor was a man (age 21, weight 75 kg, height 180 cm). The specimens had a block shape with these proportions - 2 x 2.5 x 5 mm. They were stored in physiological solution at temperature 5°C.

Before and during the measuring they were preserved in physiological solution at the room temperature (23°C). The specimens were loaded under the stress ranging between 1 - 10 MPa. [1] The orientation system were lines between trochanter major - fovea capitis femoris - crista intertrochanterica see FIG.2.

These material constants were used for FEM submodel of articular cartilage in hip joint [5,6].

The choice of mathematical model was also influenced by experimental measurement results. In our experiment - each measured sample was loaded and unloaded by loading force in several cycles and the liquid was pressed out. For this reason it wasn't necessary to explain the hysteresis effect in first loading cycles and it was also possible to describe the behaviour of measured material by equations of a small

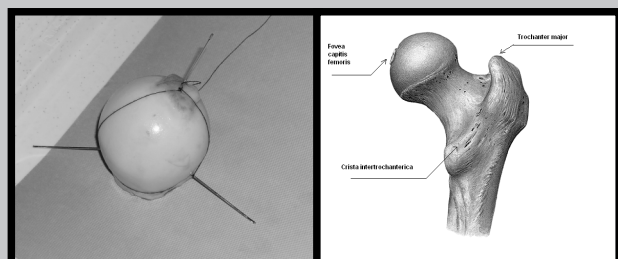


FIG.1,2. The resection caput femoris and proximal femur with the orientation system

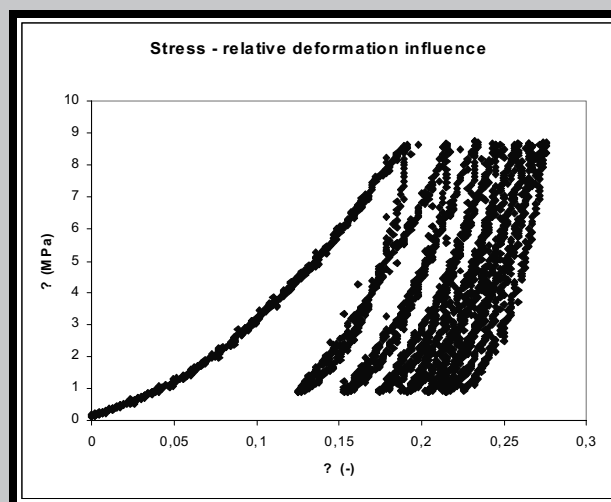


FIG. 3. Loading cycles.

deformations range (Hooke's law). After several loading cycles (app. 20% of initial dimensions deformation) the behaviour of material became linear, see FIG.3.

The measurements have been carried out in Laboratory of Biomechanics on the Faculty of Mechanical Engineering of the CTU in Prague. The mechanical tests have been carried out on test device MTS 858.2 Mini Bionix. The measured values were elaborated with statistical analysis using programme Statgraphics Plus 3.1.

The mathematical model of transversal isotropic material based on these mechanical tests was performed. These experimental results were installed into the compliance matrix S_{ij} :

$$S_{ij} = \begin{bmatrix} 1/E_1 & -\mu_{21}/E_2 & -\mu_{31}/E_3 & 0 & 0 & 0 \\ -\mu_{21}/E_2 & 1/E_2 & -\mu_{23}/E_3 & 0 & 0 & 0 \\ -\mu_{31}/E_1 & -\mu_{32}/E_2 & 1/E_3 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1/G_{23} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1/G_{13} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1/G_{12} \end{bmatrix}$$

The resulting values were determined as the arithmetical mean values in each direction. The same principle was used for Poisson's ratio determination and the modulus of elasticity in shear was calculated based on equations.

$$G_{23} = E_2/2(1 + \mu_{23}) = E_2/2(1 + \mu_{32}) \quad (1.1)$$

$$G_{12} = E_1/2(1 + \mu_{12}) = E_1/2(1 + \mu_{13}) \quad (1.2)$$

These material constants were used for FEM submodel of articular cartilage in hip joint [5,6].

Results

Failure criterion will be determined by further experimental measurements, for the present $\sigma_p=28$ MPa is used [7]. The material characteristics were used for mathematical model of articular cartilage created in FEM programme ABAQUS 6.5, see TABLE 1. The results of this project should be used for identification of the significant causes of damaging and degenerative changes of the cartilage that leads to the immobilization of joint.

E_1	E_2	E_3	G_{12}	G_{32}	μ_2	μ_3
[MPa]	[MPa]	[MPa]	[MPa]	[MPa]	[-]	[-]
144	209	209	56	83	0,26	0,28

TABLE 1.

The articular cartilage is a material inhomogeneous and anisotropic [3,4]. This biological material is composed of cells (chondrocytes), intercellular amorphous substance and fibrils [1,2]. These components are very hardly separately measurable. Due to this fact it was necessary to consider this material as a finite element of continuum mechanics. Monitoring the behavior of this material with the help of modern experimental method together with current computational software products could bring answer on causes of beginning of arthritic damage of joint.

Acknowledgements

The research is supported by the Ministry of Education project: Transdisciplinary research in Biomedical Engineering II., No. MSM 6840770012.

Reference

- [1] LePing Li, W. Herzog - A theoretical study of the mechanical response of articular cartilage to impact loading, 2003 Florida - Summer Bioengineering Conference, Page 467.
- [2] Laasanen, Toyras, Korhonen, Rieppo, Saarakkala, Nieminen, Hirvonen, Jurvelin, Biomechanical properties of knee articular cartilage, *Biorheology* 40 - 2003, pages 133 - 140.
- [3] Vrána J., Michalec J., Sedláček R., Horák Z., Koukalová J. - Measurements of mechanical properties of human articular cartilage in the hip point, 20th DANUBIA ADRIA-Symposium on Experimental Methods in Solid Mechanics, ISBN 963 9058 20 3.
- [4] Vrána J., Michalec J., Sedláček R., Horák Z., Koukalová J. - Experimental measurements of mechanical properties of human articular cartilage, SUMMER WORKSHOP OF APPLIED MECHANICS, CTU in Prague, June 2003, ISBN 80-01-02739-2.
- [5] Horák Z., Vrána J., Sochor M. - Influence of mechanical loading on the stress of hip joint, *Biomechanics of Man 2004* - hotel Horizont, Šumava Mountains, November 2004, ISBN 80-7043-315-9.
- [6] Horák Z. - Vrána J. Stress and Strain Analysis of the Hip Joint During Normal Gait Loading In: Summer Workshop of Applied Mechanics - Book of Abstracts [CD-ROM]. Prague: CTU, Department of Mechanics, 2004, s. 134-140. ISBN 80-01-02958-1.
- [7] Blaf J., Hastings G.W. - Handbook of Biomaterials Properties, London, UK, Chapman and Hall - 1988.

FINITE ELEMENT ANALYSES OF MODULAR KNEE JOINT REPLACEMENT

LUKAS ZACH, SVATAVA KONVICKOVA, PAVEL RUZICKA

LABORATORY OF BIOMECHANICS/FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING, CTU IN PRAGUE
LUKAS.ZACH@FS.CVUT.CZ

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),22-23]

Introduction

In this work I summarize the up to now progress in a development of a FE model of a knee after a total knee replacement (TKR) operation. Two of them are very simplified and the last one, quite complex but without a soft tissue, is now prepared and introduces only as a geometric model. This problem leads to a dynamic analysis containing in its final version aside all three articulating bones and its replacements also simplified models of main muscles

and ligaments.

Methods

Stress analysis of human joints with a FE code is a useful tool especially for a verification of (total) joint replacements. Our laboratory tries to develop a complex FE model because we cooperate on an evolution of a modular TKR system called WDM. WDM system is produced in a metal design (Vitalium) and mechanically and clinically tested also in a ceramic one (Zirconia).

All these models are solved with a software Abaqus/CAE. As for the geometrical models of replacements, they are provided by a producer, Walter, a.s. and if necessary, 3D CAD software Unigraphics is used.

Description of FE models

Two main projects were solved until this moment. Both are static and still very simplified compared to the real joint but they were in fact a simulation of laboratory tests. The first [1] one is a simulation of a test which had as its object to find out critical places of the ceramic knee component of the WDM [2].

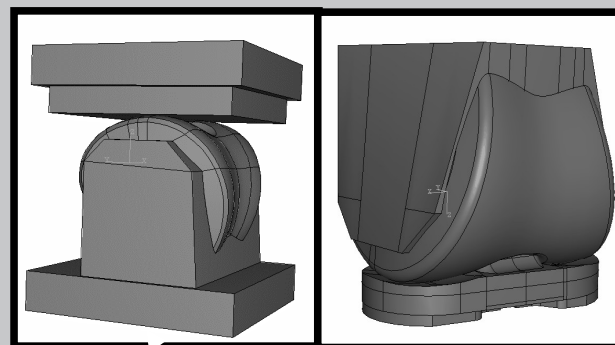


FIG. 1 a, b - Scheme of simple static FE analyses.

The second model [3] serves as pre-test analysis. The aim was to point out all the most loaded areas of a tibial plateau where would be placed a set of four strain gauges to measure deformations of a UHMWPE component. Both models are very similar and in general, they are both static and nonlinear (because of contact formulations), femur is replaced by a simplified homogenous elastic body, tibia and patella are not included. For all the structures, it is supposed that they behave according to an elastic law. For more details, see [1], [3]. All the analysis were performed for a knee in a full extension.

Complex knee joint model

While our laboratory lacks good geometric models of the articulating bones, which are necessary to create an accurate model for the analysis, some corrections had to be made during its preparations. But there is no doubt that several modifications will have to be made before the FE analysis will be carried out. An arrangement of the TKR and also of the bones toward each other in the full flexion hang together with this item.

No bone cement is presented in the problem as well as the patella and all soft tissues. The TKR consists of the femoral part, tibial plateau and its metal base (see. FIG.2).

The problem will be solved as a contact static problem (for this instance), 2 tied contacts (bone-implant interfaces) and two penalty contacts - between the TKR components.

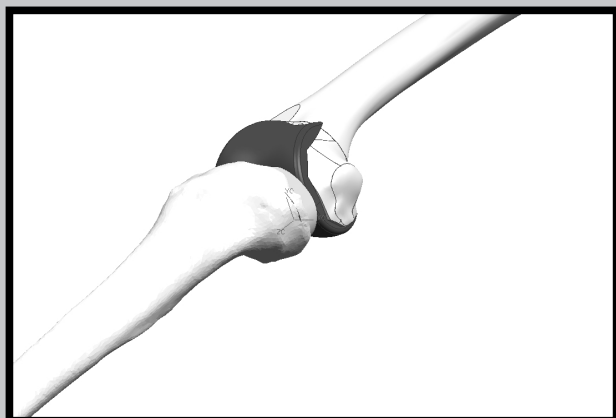


FIG. 2. Complex knee joint geometric model.

Conclusions

This work is only an initial part of a project of our laboratory which should lead to a final goal - a dynamic FE model useful for verification of a total knee replacement and well simulating the force relations inside a human knee. For this reason we chose a way of a gradual increasing of complexity of FE models and permanent validation of such models with laboratory tests. First we want to make a static model as detailed as possible and after that pass over a dynamic model.

Acknowledgements

This research is supported by a grant of Ministry of Education of the Czech Republic: MSM 6840770012.

References

- [1] Zach L., Konvickova S., Ruzicka P., Pevnostní výpočet femorální komponenty úplné náhrady kolenního kloubu. [Thesis]. Praha: ČVUT FS, Ústav mechaniky, 2004.
- [2] Sedivka V., Mechanické zkoušky keramické femorální komponenty totální náhrady kolenního kloubu. [Thesis], TU Liberec - F. Strojní, Liberec, 2000.
- [3] Zach L., Konvickova S., Ruzicka P., FEM design of a location of holes for a direct measuring of a strain by strain gauges in a tibial plato of a total knee replacement WDM, [Internal Report No. 2051/04/09]. Praha: ČVUT FS, Ústav mechaniky, Laboratoř biomechaniky člověka, 2004.
- [4] Zach L., Konvickova S., Ruzicka P., FEM model of the total knee replacement - stress analysis (part 1). Summer Workshop of Applied Mechanics - Book of Abstracts [CD-ROM]. Praha: ČVUT FS, Ústav mechaniky, 2004, p. 360-369. ISBN 80-01-02958-1.

• • • • •

MORFOLOGICAL RESULTS OF ACUPUNCTURE STIMULATION FOR SKIN WOUNDS REPARATION IN EXPERIMENT

I.O.POHO DENKO-CHUDAKOVA, A.V.ZIVENKA

BELORUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, BELARUSSIAN
COLLABORATING CENTER OF EACMFS

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),23-24]

• • • • •

Reparative and compensatory processes stimulation for quickest skin recovery is important for aesthetic surgery [1,2,3,4].

23 • • • • •

Aim

This research is to examine acupuncture stimulation effects for reparative regeneration of skin wounds in experiment.

Methods

Experiment was performed on 36 guinea pigs. The skin and subcutaneous fibrous tissue incision 3,5 cm long was made on 20 cm² of cut hair back. The periosteum was sepa-

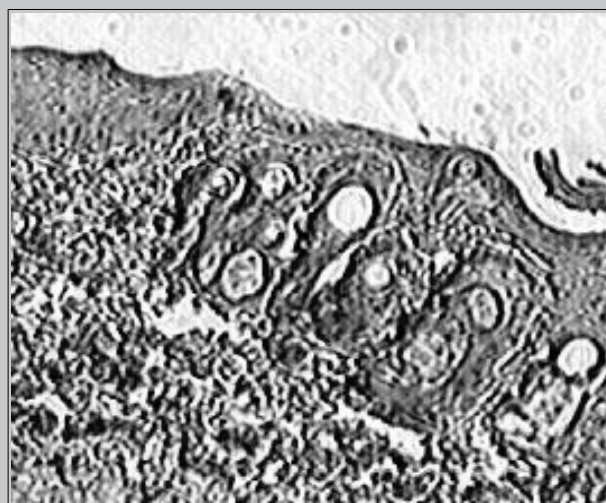


FIG. 1. Reparative regeneration of the skin wound 3 days postoperatively for the animals of the 1-st group.

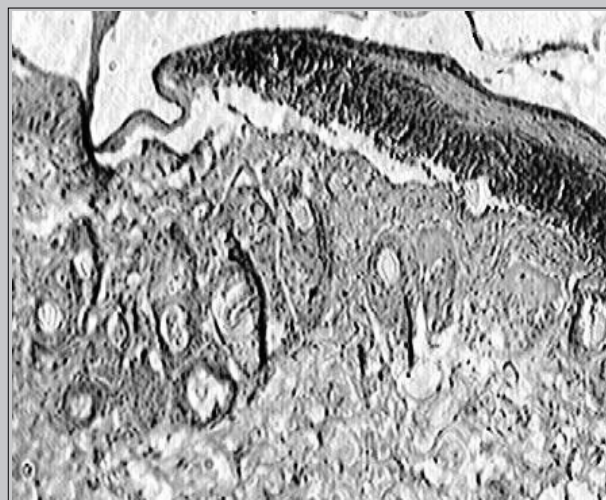


FIG. 2. Reparative regeneration of the skin wound 3 days postoperatively for the animals of the 2-nd group.

rated from the bone. Operations were carried out with Sol. Novocoini 0,25%. Once they put stitches in a wound, Viridis nitentis 1% was used to work up the wound. Animals were divided into 2 groups, 18 animals per a group. Acupuncture stimulation of the acupoint GI4 [5] was applied for the animals of the 1-st group postoperatively while 10 days. 2-nd group animals did not passed postoperative treatment. It

was a control group. Animals were removed from the experiment 3, 7, 14, days, 2 months after the operation. During investigation we determined indexes of marked nucleuses, indices of epithelium proliferation and fibroblasts. Quantitative volume of different types of cells was established by osteometry methods.

Results showed authentic difference of proliferation indexes in the 1-st group as regards control group. Epithelium proliferation and fibroblasts indices were different from coefficient of significance $p < 0,001$ for the 3-rd day. For the 7, 14-th days they were different from $p < 0,01$ and $p < 0,001$ correspondingly. Reparative regeneration of the skin wound 3 days postoperatively (FIG.1 and FIG.2)

Conclusion

Acupuncture treatment has positive influence to the processes of connective tissue and epidermis regeneration, scar formation and reorganization as well.

References

- [1] Chudakov O.P. Primary autoplasty as surgical treatment of congenital cleft palate, *Proc. of XII-th International conference on oral and maxillofacial surgery*. Hungary, Budapest. - (1995), 27.
- [2] Chudakova T.N. Deeped plasty for compound organotypic flap plasty, *Proc. of XII-th International conference on oral and maxillofacial surgery*. Hungary, Budapest. - (1995), 28.
- [3] Danilov R.K., Grigoryan B.A., Odintzova I.A. Histogenesis and tissue regeneration, *Morphology*, 109,1, (1996), 110 - 111.
- [4] Klishov A.A. Histogenesis and tissue regeneration, *Medicina*, (1984), 232.
- [5] Pohodenko-Chudakova I.O., Kremez Y.M., Zivenka A.V. Acupuncture influence to the postoperation tissue regeneration in experiment, *Abstracts IV Congr. of the Polish Associat. Oral Cranio-Maxillofacial Surg.* Bialystok, Polish, (2003), 464.

STUDY OF THE REPARETIVE OSTEOINTEGRATION PROPERTIES OF CALCIUM PHOSPHATE CERAMICS "KAFAM"

ULYANOVA T.M.*, TITOVA L.V.*, EVTUKHOV V.L.**,
BYCADOROVA L.G.***, KOVALENKO Y.D.**

*INSTITUTE OF GENERAL AND INORGANIC CHEMISTRY,
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, MINSK, BELARUS
ULYA@IGIC.BAS-NET.BY

** BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, MINSK, BELARUS

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),24-25]

Over the past decades the bone-plastic surgery has a tendency to replace bone implants by synthetic implantation materials, whose structure and composition are close to the mineral component of human bone. This tendency opens a new stage in bone-replacing surgery. Abroad and in the CIS countries comprehensive and widespread studies are being made in the fields of synthesis and medical-biological tests of material able to stimulate the processes of reparative osteogenesis [1,2].

The co-workers of the Academy of Sciences of Belarus together with the Belarusian State Medical University have

developed and studied a porous bone-replacing material based on calcium phosphate - Kafam [3]. The present paper deals with the "Kafam" osteointegration properties investigated on laboratory animals by the angio-osteoscintigraphy.

Calcium phosphate ceramics was prepared from cheap natural biological materials. During this process organic and inorganic reagents of high purity were used to clean raw material. During in vivo experiments, the calcium phosphate ceramics samples with different heat treatment temperatures: 900 (type B) and 14000 C (type D) were used and had different physical-chemical properties. The type B material had larger porosity and smaller strength, as compared to the type D one. The crystalline structure of ceramics "Kafam" of the both-type materials corresponded to hydroxyapatite with a small amount of calcium phosphate admixture.

For the biological activity of calcium phosphate material to be specified, the angio-osteoscintigraphy procedure is adopted. Usually this method finds use for evaluation of the intensity of the metabolic processes that occur during healing of animal bone defects. With the angio-osteoscintigraphy applied, experiments were made on 54 rats, on whose anterior surface of the proximal end of the tibia of the back paw a number of the defects 7-8 mm long and 2-2.5 mm wide were performed. In this case, the medullar canal was not destructed.

All operated animals were divided into three groups: 18 individuals in each group (2 tentative and 1 control). In the first group of animals the performed bone defects were filled with ceramics "Kafam" (type B). In the second group the defects were filled with ceramics "Kafam" (type D). In the third group the bone defects were repaired under a blood clot. During operation the wounds of all animals being under general anaesthesia were treated with antibiotic and were sutured. The angio-osteoscintigraphical assessments were done after 7, 14, 21, 28, 42, 56 days since surgery. For this purpose, a computerized gamma camera LEM (Firm "Siemens") and an osteotropic radio pharmacological preparation "Medronat" labeled with technetium-99 were used. In 120-150 min after preparation injection, the content of the latter in the zone of the bone defect and also in the symmetric zone of the intact bone was investigated.

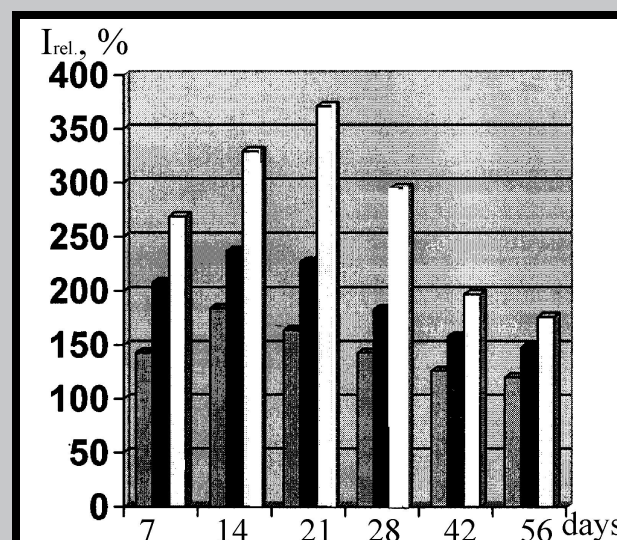


FIG. 1. Variations of the accumulated osteotropic radio pharmacological preparation content in the bony regenerative tissue during healing of the bone defect using material "Kafam".

From the experiment conducted it is found that in the group of the animals implanted with type B ceramics, the maximum accumulation of the radio pharmacological preparation was seen after 14 days and was statistically higher as against that in the control group ($236.7 \pm 8\%$). During sequential observations (after 56 days) the values of the relative level of the preparation accumulation decreased to $148.2 \pm 9.8\%$.

In the group of the animals implanted with type D ceramics, the maximum accumulation of the preparation ($371.0 \pm 31.9\%$) was registered after 21 days since surgery. After 56 days since surgery, there was seen a gradual decrease in the measured value up to $175.7 \pm 15.4\%$.

In the control group, the maximum accumulation of the osteotropic radio pharmacological preparation was registered after 14 days since surgery and corresponded to ($183.9 \pm 12.3\%$). In the subsequent periods of observation (after 56 days) the relative level of fixation of the preparation at the place of the defect gradually decreased up to $120 \pm 5.6\%$.

Analysis of the obtained results is evident of the fact that for the animals implanted with type B ceramics (1st group) or with D type ceramics (2nd group) the conditions for filling the defect with the primary bone callus were better than in the case when a blood clot (3rd group) was present in the defect cavity.

Thus, from the investigations carried out it follows that the activity of metabolic processes during healing of the bone defect implanted with calcium phosphate ceramics "Kafam" was more intense as against the control group.

References

- [1] Blijdorp P.A., Vanasche B.J.E., De Lange G.L. The hydroxylapatite - bone interface. Studies on a human biopsy. *Int. J. Oral Maxillofac. Sur.*, 17 (1988), 354-357.
- [2] Iordanashvili A.K. Surgical treatment of periodontitis and maxilla cysts. S.-Petersburg, Published by Normed, 2000. 224 p.
- [3] Ulyanova T.M., Titova L.V., Evtukhov V.L., Chudakov O.P., Bykadorova L.G. A new bioactive bone-replacing material for maxillofacial surgery. *J. Engineering of Biomaterials*, 5(2002), 23-25, 7.

• • • • •

COPOLYMERS OF L-LACTIDE AND TRIMETHYLENE CARBONATE EVALUATION OF SURFACE PROPERTIES AND DEGRADATION IN AQUEOUS MEDIUM

ELŻBIETA PAMUŁA*, ELODIE GAUGAIN**, AURÉLIE DESSART**, PIOTR DOBRZYŃSKI***

*AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND
EPAMULA@AGH.EDU.PL

**UNIVERSITÉ DU MAINE, INSTITUT UNIVERSITAIRE DE TECHNOLOGIE DU MANS, AVENUE OLIVIER MESSIAEN, 72-085 LE MANS, FRANCE

***CENTRE OF POLYMER CHEMISTRY, POLISH ACADEMY OF SCIENCES, UL. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34/20, 41-819 ZABRZE, POLAND

Abstract

Two poly(L-lactide-co-trimethylene carbonates) having the carbonate content of 15% and 50%, respectively were prepared by ring-opening copolymerization with the use of zirconium acetylacetonate as an initiator. The copolymers were characterized by NMR, GPC, DSC and AFM. Wettability and surface energy of the copolymers were also evaluated. The copolymers were submitted to degradation in phosphate buffered saline at 37°C for 10 weeks. It was shown that degradation mechanism and kinetics depend on chemical structure of the copolymers.

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),25-27]

Introduction

Polycarbonates and poly(a-hydroxy acids) have attracted much attention recently, because they degrade both in vitro and in vivo through hydrolysis reaction. Their big advantage is that their degradation products, namely carbonates and carboxylic acids might be metabolized by the living body [1]. Polymers derived from carbonic acid show, however less tendency towards hydrolysis than that with an ester linkage [2]. On the other hand, degradation of poly(a-hydroxy acids) often leads to local increase of acidity what may be harmful to the surrounding tissue, while polycarbonates do not cause pH decrease [3]. Therefore, copolymerization of both types of monomers may result in a wide variety of resorbable materials which might be attractive for medicine, pharmacy and tissue engineering. In this paper we characterize two recently synthesized copolymers of L-lactide and trimethylene carbonate and study their degradation in aqueous medium in order to evaluate their usefulness in medical and tissue engineering applications.

Materials and methods

Copolymers synthesis and foils preparation

1,3-trimethylene carbonate (Boeringer Ingelheim, Germany) and L-lactide (Purac, The Nederland) were purified by recrystallization from dry ethyl acetate in a vacuum dryer at a room temperature. Copolymerization was performed in bulk with a $Zr(acac)_4$ initiator (Aldrich, Germany) at 110°C by a conventional method using a vacuum line for degassing and sealing of the ampoules. The copolymers were purified by dissolution in chloroform and precipitation in methanol. Subsequently, the copolymers were dried under reduced pressure at 25°C until constant weight was obtained. Copolymer foils, having the thickness of 0.18 ± 0.01 mm, were obtained by slip casting from 10 % (w/v) copolymer solution in methylene chloride (POCH S.A., Gliwice, Poland), followed by air and vacuum drying under reduced pressure at 25°C for at least 24h.

Characterization methods

The composition of the copolymers was determined by 1H NMR measurements (Varian Unity Inova spectrometer). Molecular masses M_n and M_w of the copolymers were determined by gel permeation chromatography with the Physics SP 8800 chromatograph. Thermal properties, such as glass-transition temperature (T_g), melting temperature (T_m) and heat of melting (ΔH_m) were studied by differential scanning calorimetry with DuPont 1090B apparatus calibrated with gallium and indium.

Topography measurements were performed with an Explorer atomic force microscope (ThermoMicroscopes, Veeco, USA). Contact mode topographic images were recorded using Si₃N₄ tips with a spring constant of 0.05 N/m and a nominal radius of curvature of 20 nm (Veeco NanoProbe™ Tips, model MLCT-EXMT-A). The images were recorded at scan areas 100 μm×100 μm for three aleatory chosen places (300×300 data points) and with scan rate of 3 lines/s. All images were flattened using a third order polynomial algorithm provided with the instrument. Ra roughness was also calculated.

The contact angle was measured by sessile drop method by an automatic drop shape analysis system DSA 10 Mk2 (Kruss, Germany). UHQ-water (produced by Purelab UHQ, Elga, Germany) and diodomethan (Aldrich, Germany) droplets of the volume of 0.2 μl were put on each sample and the contact angle was obtained by averaging the results of 10-12 measurements. Surface energies of the copolymers (total, dispersive part and polar part) were calculated according to the Owens-Wendt-Rabel-Kaelble method.

Degradation study

Degradation of copolymer foils was performed in 0.9% sodium chloride solution buffered with 24 mM Na₂HPO₄ and 16 mM KH₂PO₄ (PBS-solution) of pH=7.0 at 37°C. Foils weighing 0.2 g were incubated in 100 ml of buffer in plastic vials for 10 weeks. The buffer was exchanged every week. After every week foils were washed ten times in UHQ water (PureLab UHQ, Elga, Germany) and dried in a vacuum oven at 25°C for 72 h.

Another set of samples (0.5 g) was incubated in 100 ml of UHQ water at 37°C and pH and conductivity of water, at 25°C, were evaluated once a week.

Results and discussion

Properties of copolymers

sample	N _{TMC} [mole %]	M _n [kDa]	d	T _g [°C]	T _m [°C]	ΔH _m [J/g]	χ
I (85:15)	15	35	2.2	32.7	191.3	65.9	70
II (50:50)	50	58	1.8	20.8	166.5	15.7	17

N_{TMC} – molar fraction of trimethylene carbonate; M_n – number-average molecular weight; d – polydispersion index, d = M_w/M_n; T_g – glass transition temperature; T_m – melting temperature; ΔH_m – heat of melting; χ – degree of crystallinity;

TABLE 1. Structural properties of the poly(L-lactide-co-trimethylene carbonates)s.

TABLE 1 presents structural properties of two copolymers of L-lactide and trimethylene carbonate P(L-TMC). A molar fraction of trimethylene carbonate in the copolymers is 15 and 50, respectively, as determined by ¹H NMR. GPC results show, that the copolymer 85:15 has lower number

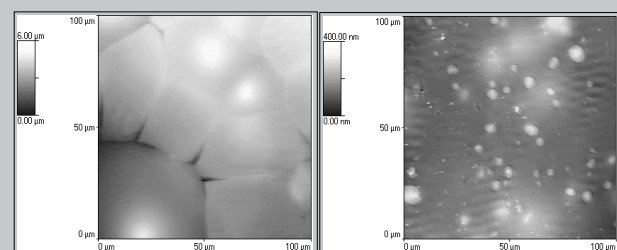


FIG. 1. AFM topographical images of P(L-TMC): a) 85:15 (x=y=100 μm, z=6 μm) and b) 50:50 (x=y=100 μm, z=400 nm).

sample	R _a [nm]	θ [°]	γ [mJ/m ²]	γ _d [mJ/m ²]	γ _p [mJ/m ²]
I (85:15)	380 (100)	96 (3)	39.7 (0.9)	39.5 (0.8)	0.2 (0.1)
II (50:50)	50 (13)	76 (3)	42.9 (1.2)	37.4 (0.9)	5.5 (0.3)

R_a – roughness, standard deviation in brackets, n=3; θ – water contact angle; γ – total surface energy; γ_d – dispersive part of surface energy; γ_p – polar part of surface energy (standard deviation in brackets, n=12)

TABLE 2. Surface properties of the poly(L-lactide-co-trimethylene carbonates)s

average molecular weight and higher polydispersion than the copolymer 50:50. The copolymer 85:15 has also higher glass transition and melting temperatures as well higher heat of melting, what indicates that it is also much more crystalline than the copolymer 50:50. The heat of melting of the copolymers can be compared to the value of the heat of melting of the crystalline regions of poly-L-lactide, ΔH_m=93.1 J/g [5]. Hence, the relative degree of crystallinity of the copolymer 85:15 is 70% while that of copolymer 50:50 is only 17%.

FIG. 1 presents AFM topographical images of the surface of foils prepared from two copolymers. On the surface of the copolymer 85:15 ringed spherulitic crystalline structures are visible. The height of the structures attains 6 μm, while their diameter ranges from 20 to 60 μm. On the other hand, the surface of 50:50 copolymer is more smooth and only small ringed structures of the height of hundreds nanometers and diameter of 3-10 μm are visible. The surface roughness (R_a) of the copolymer 85:15 is much higher than that of 50:50 [TABLE 2].

TABLE 2 presents the results of water contact angle and surface energy of the two copolymers. The surface of the copolymer 85:15 is very hydrophobic (contact angle of 96°), while that of 50:50 is much hydrophilic (contact angle of 76°). Interestingly, the surface free energy of 85:15 is low and consist only of a dispersive component, whereas that of 50:50 consist of both dispersive and polar parts.

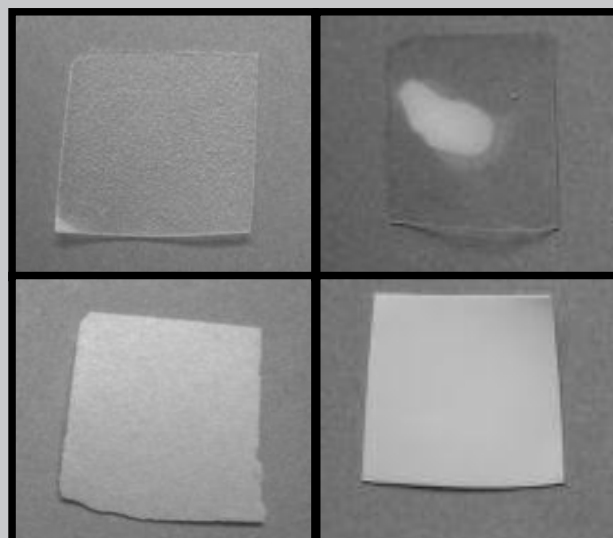


FIG. 2. Gross morphology of P(L-TMC) foils (squares ca. 1cm×1cm) before A-85:15, B-50:50 and after incubation in PBS for 7 weeks: C-85:15, D-50:50.

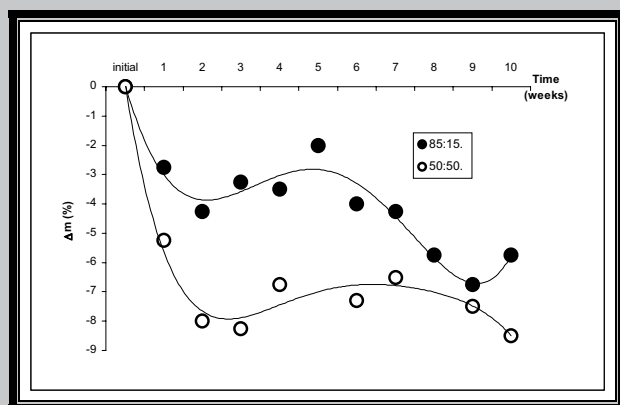


FIG. 3. Relative mass changes of P(L-TMC) foils as a function of incubation time in PBS.

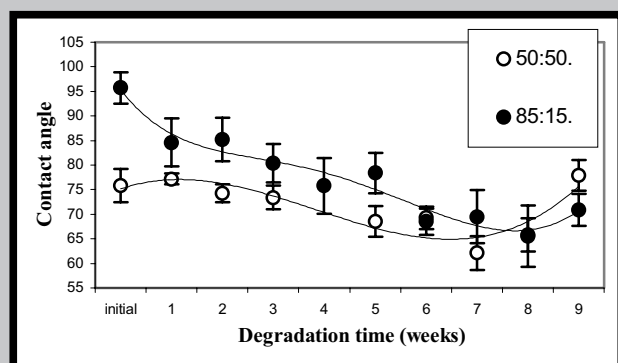


Fig. 4. Evolution of water contact angle of P(L-TMC) foils as a function of degradation in PBS.

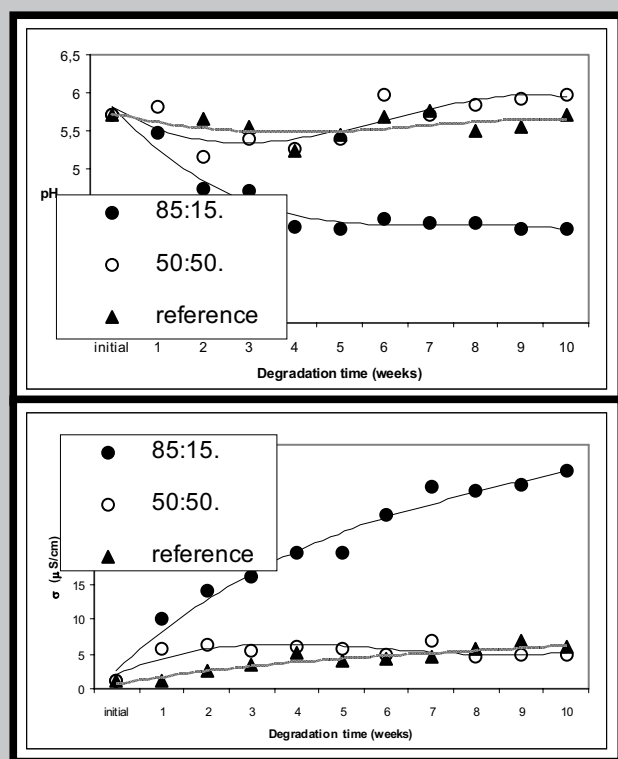


FIG. 5. Evolution of pH and conductivity of UHQ water with P(L-TMC) foils as a function of degradation time in PBS.

Degradation study

FIG.2 shows a gross morphology of P(L-TMC) foils before and after incubation in PBS. The foils 85:15 are less transparent than that of 50:50 in accordance to their crystalline structure. After incubation the foils become opaque, suggesting an increase in crystallinity. It is caused by relatively higher mobility of short polymeric chains, which can organize much more easily. The foils 85:15 are dimensionally stable for 5 weeks, afterwards they become fragile with negligible strength, while the foils made of copolymer 50:50 are stable for the whole experimental period, e.g. 10 weeks. FIG.3 and 4 present the evolution of mass change and contact angle, respectively as a function of incubation in PBS. During two weeks of degradation the sample 50:50 loses already 8% of its mass. Afterwards the mass of the foil does not change considerably. Loss of mass in the case of sample 85:15 is much more uniform. The contact angle of 50:50 do not change considerably during the whole experimental period, while that of 85:15 decreases from 95° to about 75°. FIG.5 presents evolution of pH and conductivity of UHQ water containing analyzed copolymer foils as a function of incubation time. Foils made of the 50:50 copolymer do not have an impact on pH and conductivity, while foils made of 85:15 cause a decrease of pH and an increase of conductivity. This may suggest that degradation products, having acidic properties are released from the P(L-TMC) 85:15 to the liquid environment.

The results show that hydrolytic stability depends on structure and composition of the poly(L-lactide-co-trimethylenecarbonate)s. The copolymer having the carbonate content of 15% degrades very fast despite its high crystallinity and hydrophobicity. After the 5-week incubation it becomes brittle and loses its integrity. Moreover it brings about a decrease of pH of the incubation medium. Note that degradation of homopolymer of L-lactide is very slow and takes at least 2 years [6]. The copolymer having 50% of trimethylene carbonate degrades more slowly: the foils retain their form for 10 weeks, however they turned opaque. It may suggest that degradation proceeds in bulk.

Acknowledgement

This work was financed by the Minister of Science and Information Society Technologies, as a research project No 082/T08/2002).

References

- [1] Bezwada R. S., Jamiolkowski D. D., Lee I., Agarwal V., Persivale J., Trenka-Benthin S., Erneta M., Suryadevara J., Yang A., Liu S., "Monocryl suture, a new ultra-pliable absorbable monofilament suture" *Biomaterials* 16 (1995) 1141-1148.
- [2] Acemoglu M. "Chemistry of polymer biodegradation and implications on parental drug delivery". *International Journal of Pharmaceutics* 277 (2003), 133-139.
- [3] Matsumura S., Tsukada K., Toshima K., "Novel lipase-catalyzed ring-opening copolymerization of lactide and trimethylene carbonate forming poly(ester carbonate)s" *International Journal of Biological Macromolecules* 25 (1999) 161-167.
- [4] Södergård A., Stolt M., "Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition". *Progress in Polymer Science* 27 (2002), 1123-1163
- [5] Fisher E.W., Sterzel D. J., Wegner G., *Kolloid-Z. u. Z. Polymere* 251 (1973) 980-990
- [6] Chandra R., Rustgi R., "Biodegradable Polymers" *Progress in Polymer Science* 23 (1998) 1273-1335.

WPŁYW SKŁADU CHEMICZNEGO I PARAMETRÓW SPIEKANIA NA WŁAŚCIWOŚCI TWORZYW KALCYTOWYCH

SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI, ZBIGNIEW JAEGERMANN,
JOANNA KARAŚ

INSTYTUT SZKŁA I CERAMIKI,
UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA
BIOCERAMIKA@NEOSTRADA.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),28-29]

Wprowadzenie

Celem niniejszych badań była optymalizację właściwości fizycznych tworzyw kalcytowych na nośniki żywych komórek, służących do regeneracji tkanki kostnej metodą inżynierii tkankowej, poprzez modyfikację składu chemicznego oraz dobór obróbki termicznej tworzyw.

Materialy i metody

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono badania tworzyw kalcytowych zawierających różne zawartości fluorku litu od 0,9% do 10% (TABELA 1). Próbki do badań formowano przez prasowanie jednoosiowe i wypalano w temperaturach: 450, 470, 490, 510 i 530°C z przetrzymaniem 6 godzin. Analizę uziarnienia zestawów tworzyw przeprowadzono przy pomocy laserowego analizatora wielkości cząstek. Gęstość pozorną wyprasek i spieków oznaczono metodą geometryczną, a wytrzymałość oceniano na podstawie testu na ściskanie. Wykonano także wyciągi wodne z otrzymanych tworzyw i oznaczono ich odczyn pH w temperaturze 37°C.

Omówienie wyników badań

Z przeprowadzonych badań wynika, że tworzywa o zawartości fluorku litu 0,9% i 5% w składzie zachowują się podobnie podczas spiekania. Najwyższą gęstość pozorną i wytrzymałość na ściskanie osiągają one w temperaturze 510°C, natomiast w temperaturze 530°C obserwuje się wyraźny spadek wartości tych parametrów. Tworzywo o zawartości fluorku litu 10% ulega właściwemu zagęszczeniu dopiero w temperaturze 530°C. Obserwacje mikrostruktury powierzchni badanych tworzyw, przedstawione na RYS.4, potwierdziły również te zależności. W temperaturze 490°C tworzywo CC-1FMK jest w dużym stopniu zagęszczone, z niewielką tylko ilością porów, tworzywo CC-5FMK charakteryzuje się dużą porowatością, natomiast tworzywo CC-10FMK praktycznie nie wykazuje oznak spiekania ziaren węglanu wapnia. W temperaturze 510°C tworzywa o zawartości fluorku litu 0,9% i 5% są dobrze spieczone, a na powierzchni tworzywa o zawartości 10% widoczne są jeszcze liczne pory. Badania pH wyciągów wodnych otrzymanych tworzyw przedstawiono na RYS.3. Notuje się wzrost odczynu pH wraz ze wzrostem stopnia ich zagęszczenia. Dla dobrze zagęszczonych próbek odczyn pH wyciągów kształtują się na poziomie od 10,8 do 10,9.

Podsumowanie

W świetle przeprowadzonych badań można stwierdzić, że zarówno skład chemiczny tworzyw kalcytowych, jak i

THE INFLUENCE OF CHEMICAL COMPOSITIONS AND SINTERING PARAMETERS ON THE PROPERTIES OF CALCITE MATERIALS

SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI, ZBIGNIEW JAEGERMANN,
JOANNA KARAŚ

INSTITUTE OF GLASS AND CERAMICS, BIOCERAMIC DEPARTMENT
9, POSTĘPU STREET, 02-676 WARSAW
BIOCERAMIKA@NEOSTRADA.PL

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),28-29]

Introduction

The aim of the present work is to evaluate the properties of calcite materials in order to select the most suitable one for calcite carriers of living cells for bone regeneration by tissue engineering method.

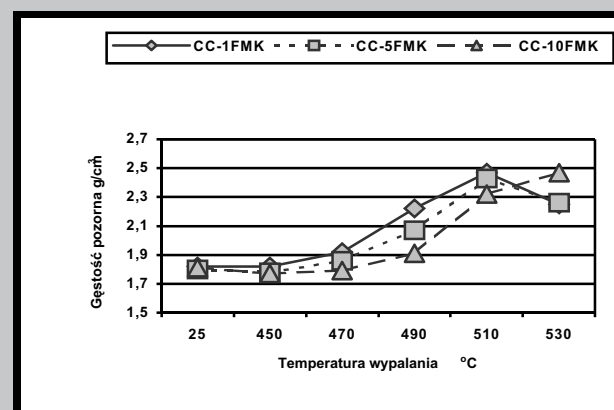
Materials and methods

Three calcite materials based on CaCO_3 (calcite pure, POCh) containing 0,9 to 10wt% of lithium fluoride LiF (pure, Riedel-deHaën) were evaluated within the research (TABLE 1). Testing samples were formed by uniaxial pressing and sintered in temperatures of 450, 470, 490, 510 and 530°C with 6 hours of dwell time. Green density and apparent density were determined by geometrical method. Relative density was calculated on the basis of polycrystalline parametry ich obróbki cieplnej mają decydujący wpływ

Symbol zestawu	Zawartość Content of [%mas.]		Średnie ziarno Medium grain size d_{50} [μm]	Gęstość pozorną wyprasek Green density [g/cm^3]
	CaCO_3	LiF		
CC-1FMK	99,1	0,9	2,96	1,82
CC-5FMK	95,0	5,0	3,06	1,80
CC-10FMK	90,0	10,0	2,91	1,81

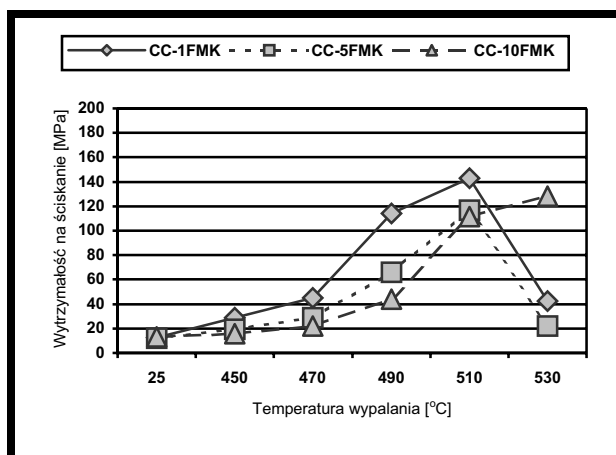
TABELA 1. Składy zestawów tworzyw kalcytowych.

TABLE 1. Compositions of calcite materials.

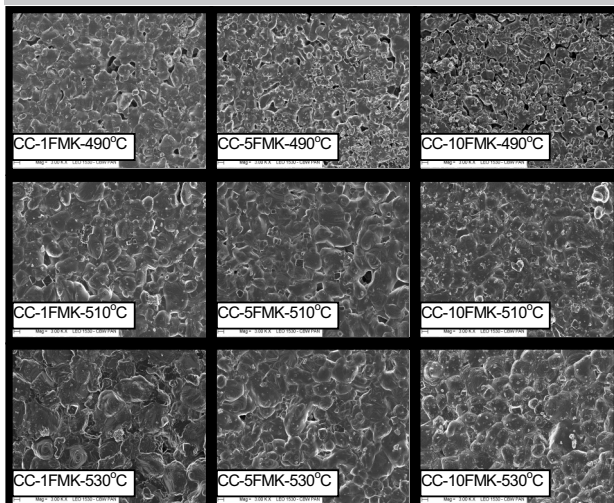


RYS. 1. Zależność gęstości pozornej od temperatury spiekania tworzyw kalcytowych.

FIG. 1. Apparent density vs sintering temperature of calcite materials.



RYS. 2. Zależność wytrzymałości na ściskanie od temperatury spiekania tworzyw kalcytowych.
FIG. 2. Compressive strength vs sintering temperature of calcite materials.



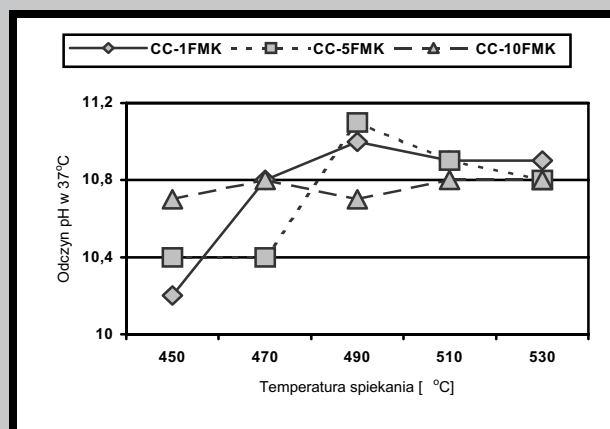
RYS. 4. Zależność mikrostruktury powierzchni tworzyw kalcytowych od temperatury spiekania.
FIG. 4. Surface microstructure vs sintering temperature of calcite materials.

na ich właściwości fizyczne, wytrzymałościowe i mikrostrukturę powierzchni, a mianowicie:

- wzrost zawartości fluorku litu w tworzywie podnosi jego temperaturę spiekania,
- przekroczenie optymalnej temperatury spiekania powoduje gwałtowny spadek wytrzymałości tworzyw na ściskanie,
- zastosowanie dodatku LiF w ilości 0,9% i 5% oraz temperatury wypalania 510°C z przetrzymaniem 6 godzin, a także dodatku 10% LiF i temperatury 530°C pozwala na uzyskanie dobrze zagęszczonych tworzyw kalcytowych o wysokiej wytrzymałości mechanicznej, przydatnych do wytwarzania nośników komórek.

Podziękowanie

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji w ramach projektu badawczego zamawianego Nr 05/PBZ-KBN-082/2002.06



RYS. 3. Zależność odczynu pH od temperatury spiekania tworzyw kalcytowych.
FIG. 3. pH reaction vs sintering temperature of calcite materials.

erties were evaluated on the basis of compression tests. Tests of pH reaction of aqueous extracts from the materials were also done.

Results

The results of our studies show that the materials CC-1FMK and CC-5FMK behave in a similar way during sintering. They achieve the highest apparent density and compressive strength in the temperature of 510°C, but in 530°C a rapid decrease of both parameters can be observed. The material containing 10wt% LiF sinters well only in the temperature of 530°C (FIG.1 and 2). The surface microstructure of these materials confirms the foregoing dependences. In the temperature of 490°C the material CC-1FMK shows high rate of compaction, the material CC-5FMK is still quite porous and the material CC-10FMK is only slightly sintered (FIG.4). In the temperature of 510°C the surface microstructure of materials CC-1FMK and CC-5FMK shows good compaction, but material CC-10FMK still contains open pores on its surface. pH reaction of aqueous extracts of tested materials increases with the increase of compaction degree. For well sintered samples pH reaction is similar and ranges between 10,8 and 10,9 (FIG.3)

Summary

Analysis of the results demonstrated that both chemical composition and thermal treatment highly influence physical and mechanical properties as well as microstructure of calcite materials:

- higher content of LiF in the material (between 0,9 and 10wt%) increases its optimal sintering temperature,
- exceeding of optimal sintering temperature causes a rapid decrease of compressive strength of these materials,
- the proper selection of chemical composition and sintering parameters allows to obtain well compacted and mechanically tough calcite materials, which can be used for preparing carriers for living cells.

Acknowledgement

This work was supported by the Minister of Science and Information Society Technologies (grant No. 05/PBZ-KBN-082/2002/06)

WPŁYW JONÓW GLINU NA STRUKTURĘ TKANKI OSIERDZIA ŚWINI, BADANEJ Z UŻYCIEM EPR - METODY ZNACZNIKÓW SPINOWYCH

BEATA C WALINA, LECHOSŁAW DUL, MARIA JASTRZĘBSKA

KATEDRA BIOFIZYKI, ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA,
OSTROGÓRSKA 30, 41-200 SOSNOWIEC;
C WALINA@SLAM.KATOWICE.PL

Streszczenie

Celem pracy była ocena zmian struktury tkanek osierdžia świni, poddanych działaniu jonów glinu (w postaci siarczanu $Al_2(SO_4)_3$ oraz wodorotlenku $Al_2O_3 \cdot nH_2O$ w preparacie ALUSAL), z zastosowaniem spektroskopii EPR - metody znaczników spinowych (znacznik spinowy: 4-izotiocyaniano-TEMPO; 4ITCTO). Wykazano, że traktowanie tkanki osierdžia świni jonami glinu prowadzi do zwiększenia sztywności struktury wewnętrznej tkanki. Ujawniły to zmiany kształtu widma EPR znacznika 4ITCTO związanego z tkanką. Jakkolwiek efekty stabilizacji tkanki jonami Al^{3+} i aldehydem glutarowym są podobne, jednak mechanizmy sieciowania białek tkankowych są różne.

Słowa kluczowe: tkanka, osierdzie świni, sieciowanie, jony glinu, glutałdehyd, EPR, znakowanie spinowe.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),30-33]

Wprowadzenie

Przez wiele lat uważano, że substancje zawierające glin są nieszkodliwe dla zdrowia. Dlatego zasadowe związki glinu są stosowane w leczeniu stanów nadkwaśności żołądka, szczególnie w chorobie wrzodowej. Do popularnych preparatów zawierających glin należą: Alugastrin, Alumag, Maalox, Gelatum Aluminium Phosphoricum, a także ALUSAL zawierający koloidalny wodorotlenek glinu (III) [1].

Glin wchłania się z przewodu pokarmowego i ulega kumulacji w tkankach. Jego toksyczność nie jest w pełni poznana. Uważa się, że zwiększona zawartość glinu w tkankach organizmu jest niekorzystna dla zdrowia. Objawami nadmiernej kumulacji tego pierwiastka w tkance mózgowej są zaburzenia pamięci i zaburzenia równowagi. Uszkodzenie neuronów jest przeważnie nieodwracalne. Wielu badaczy łączy choroby Alzheimera i Parkinsona z akumulacją glinu w organizmie. Metal ten występuje nie tylko w wymienionych lekach, ale także w wielu produktach spożywczych: napojach przechowywanych w puszkach aluminiowych, pokarmach pieczonych w folii aluminiowej lub gotowanych w naczyniach aluminiowych, itp.

Kolagen jest jednym z głównych składników białkowych tkanki łącznej, a więc i każdego narządu zawierającego tę tkankę [2,3]. Obficie występuje w skórze, ścięgnach, chrząstkach, kościach, zębach, ścianach naczyń krwionośnych i błonach. Jest również obecny w osierdziu, zastawkach serca oraz wielu innych tkankach. Glicyna stanowi co trzeci aminokwas w cząsteczce kolagenu. Glicynę poprzedza hydroksypolina (aminokwas charakterystyczny dla kolagenu), a po glicynie następuje prolina. Ponadto w kolagenie występuje rzadko spotykany aminokwas - hydroksylizyna [2]. Elastyna jest białkiem występującym w większości tkanek łącznych wspólnie z kolagenem i polisacharydami [4].

THE INFLUENCE OF ALUMINIUM IONS ON THE PORCINE PERICARDIUM TISSUE STRUCTURE INVESTIGATED BY EPR - SPIN LABELING METHOD

BEATA C WALINA, LECHOSŁAW DUL, MARIA JASTRZĘBSKA

DEPARTMENT OF BIOPHYSICS, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA,
OSTROGÓRSKA 30, 41-200 SOSNOWIEC;
C WALINA@SLAM.KATOWICE.PL

Abstract

The aim of this work was to elucidate changes in the structure of porcine pericardium tissues treated with the aluminium ions (in the form of sulphate salt $Al_2(SO_4)_3$ or hydroxide $Al_2O_3 \cdot nH_2O$ in the ALUSAL preparation), using the EPR spectroscopy - spin labeling method (spin label: 4-Isothiocyanato-TEMPO; 4ITCTO). It has been demonstrated that the treatment of the porcine pericardium tissue with aluminium ions leads to enlargement of stiffness of the tissue internal structure. It was visible by the shape changes in the EPR spectra of 4ITCTO label attached with the tissue. Although results of the tissue stabilization by Al^{3+} ions and glutaraldehyde are similar, however mechanisms of the tissue proteins cross-linking are different.

Key words: tissue, porcine pericardium, crosslinking, aluminium ions, glutaraldehyde, EPR, spin labeling.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),30-33]

Introduction

For many years it has been considered that aluminium-containing substances are harmless for the health. Thus, the alkaline preparations containing aluminium are used for stomach hyperacidity treatment, especially in the ulcerous diseases. The popular pharmaceuticals used for this purposes are: Alugastrin, Alumag, Maalox, Gelatum Aluminium Phosphoricum, and also ALUSAL that contains colloidal aluminium hydroxide (III) [1].

Aluminium is absorbed from the alimentary canal and cumulated in tissues. Its toxicity is not fully recognized. One attends that enlarged concentration of aluminium in tissues is unprofitable for the health. Symptoms of the excessive cumulation of this element in the brain tissue are perturbations in the memory and ballance. The neurons damage is mostly irreversible. Many investigators link the Alzheimer's and the Parkinson's diseases with the aluminium cumulation in the organism. This metal is present not only in mentioned drugs, but also in many grocery products: drinks kept in the aluminium cans, foods roasted in tinfoil or boiled in aluminium dishes, etc.

The collagen is one of main protein components in the connective tissue, so every organ containing this tissue [2,3]. Abundantly collagen appears in the skin, tendons, gristles, bones, teeth, walls of blood-vessels and membranes. It also is present in the pericardium, heart valves and many other tissues. Glycine is each the third amino-acid in the collagen molecule. The glycine is preceded by the hydroxyproline (the amino acid characteristic for the collagen), and followed

Jest ona podstawowym składnikiem włókien elastycznych i sprężystych. Podobnie, jak w kolagenie, jedną trzecią reszt stanowi glicyna, jednak elastyna nie zawiera hydroksylizyny.

W celu stabilizacji biomateriałów tkankowych stosuje się najczęściej sieciowanie tkanek bogatych w kolagen za pomocą aldehydu glutarowego (glutaraldehydu; GA) [5, 6]. W garbarstwie w charakterze substancji sieciującej wykorzystuje się między innymi jony glinu (Al^{3+}) [7].

Oddziaływanie białek z różnymi składnikami komórek można badać różnymi metodami, włączając elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR), z wykorzystaniem znaczników spinowych (wolnych rodników) związanych kowalencyjnie z białkami [8, 9]. Przykładowo, znacznik spinowy 4-izotiocyaniano-TEMPO (4ITCTO) reaguje z grupami aminowymi białek [8]. Zmiany kształtu widm EPR znaczników spinowych umożliwiają monitorowanie modyfikacji ich struktury [10,11]. Znaczniki spinowe są stosowane przeważnie w formie roztworów wodnych. Badany materiał biologiczny jest inkubowany w roztworze znacznika; nadmiar znacznika jest usuwany przez dializę lub odmycie.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu glinu (w postaci siarczanu $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ oraz wodorotlenku $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ w preparacie ALUSAL) na strukturę tkanki osierdzia świni, z wykorzystaniem spektrometrii EPR - metody znaczników spinowych. Analiza widm EPR znacznika spinowego 4ITCTO związanego z tkanką natywną i modyfikowaną za pomocą GA umożliwiła śledzenie efektów sieciowania tkanki wskutek działania jonów Al^{3+} (z soli lub leku).

Materiały i metody

Badanymi materiałami były tkanki osierdzia świni, pobierane bezpośrednio po uboju zwierząt. Próbkę tkanek sieciowano przez 2 godziny z użyciem roztworów bazujących na PBS (PBS - solanka buforowana fosforanami; ang.: phosphate-buffered saline; pH 6,5), z dodatkiem 0,15% GA, 1,0% $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ lub 2% ALUSALu (tabletki; Polfa) zawierającego wodorotlenek glinu $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Próbkę natywną i modyfikowaną inkubowano w roztworze znacznika spinowego 4-izotiocyaniano-TEMPO w 4°C przez 24 h. Po tym czasie nadmiar znacznika odmywano 10-krotnie, stosując wirowanie (6000 obr/min). Pomiędzy każdym wirowaniem próbkę płukano roztworem PBS. Następnie materiał umieszczano w kapilarze o średnicy 0,8 mm i wykonywano pomiary z użyciem spektrometru EPR firmy Radiopan-Poznań. Widma próbek rejestrowano za pomocą spektrometru EPR typ SE/X 2542, z rezonatorem cylindrycznym TM110. Stosowano moc mikrofalową ok. 100 mW z modulacją częstotliwości 100 kHz, amplitudę modulacji 0,08 mT oraz czas rejestracji 16 min. ze stałą czasową 1s. Pomiary prowadzono w temperaturze pokojowej.

Wyniki i dyskusja

Typowe widmo EPR znacznika spinowego 4ITCTO inkorporowanego do natywnej tkanki osierdzia świni przedstawiono na RYS.1, ukazującym linie charakterystyczne dla rodników: poruszającego się szybko, słabo związanego (wąska linia hw) i poruszającego się wolno, silnie związanego (szeroka linia hs). Analiza widm eksperymentalnych została przeprowadzona na podstawie obliczonego stosunku hw/hs, który jest bardzo wrażliwą miarą stanu fizycznego białek w błonach biologicznych [8].

Porównanie widm EPR (RYS.2) znacznika spinowego 4ITCTO inkorporowanego do tkanek osierdzia świni: natywnej oraz modyfikowanych GA lub jonami Al^{3+} (pochodzącymi z soli siarczanowej lub preparatu ALUSAL) pozwoliło okre-

być proline. Besides, in the collagen contains also hydroxylysine being rare amino-acid [2]. The elastin is protein that occurs in the most connective tissues jointly with the collagen and polysaccharides [4]. It is a main component of elastic and resilient fibers. Similarly to the collagen, each the third amino-acid is glycine, but elastin does not contain hydroxylysine.

For stabilization of tissular biomaterials, the cross-linking of the collagen-rich tissues by means of glutaraldehyde (GA) is most often used [5, 6]. Among cross-linking agents effective in the leathers tanning, the aluminium ions (Al^{3+}) may be mentioned [7].

The proteins interaction with different components of cells may be studied by various methods, including electron paramagnetic resonance (EPR) employing spin labels (free radicals) covalently bonded to proteins [8,9]. For example, the spin label 4- Isothiocyanato-TEMPO (4ITCTO) reacts with amine groups of the proteins [8]. Changes in the EPR-spectra of spin labels allowed monitoring the structural modification [10,11]. Spin labels are mostly used in the form of aqueous solutions. Biological material being investigated is incubated in the label solution; the label excess is removed by dialysis or washing off.

The aim of the present work was to examine the influence of aluminium (in the form of sulphate salt $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ or hydroxide $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ in the ALUSAL preparation) on structure of the porcine pericardium tissue, using the EPR spectrometry - method of the spin labeling. Analysis of the EPR spectra of the 4ITCTO bonded to the tissues: native and GA-modified, allowed monitoring the cross-linking effects in the tissues under the action of the Al^{3+} ions (from salt or drug).

Materials and methods

The investigated materials were porcine pericardium tissues sampled directly after slaughtering of animals. The tissue samples have been crosslinked for 2 hours, using PBS-based solutions (PBS - phosphate-buffered saline; pH 6,5), supplemented with 0,15% GA, 1,0% $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ or 2% ALUSAL (tablets; Polfa) containing aluminium hydroxide $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Native and modified samples have been incubated in solution of spin label 4-Isothiocyanato-TEMPO at 4°C for 24 h. After this time, an excess of the label has been washed 10 times using centrifugation (6000 r.p.m.). Between each of centrifugations, the sample was rinsed with PBS. Afterwards the material has been placed into capillary vessel of 0,8 mm diameter and measurements have been carried out using the EPR spectrometer (Radiopan-Poznań). The samples' spectra have been recorded by means of EPR spectrometer type SE/X 2542 with cylindrical TM110 resonator. The microwave power nearly 100 mW with modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 0,08 mT, and scan time 16 min with time constant 1 s have been used. Measurements have been carried out at room temperature.

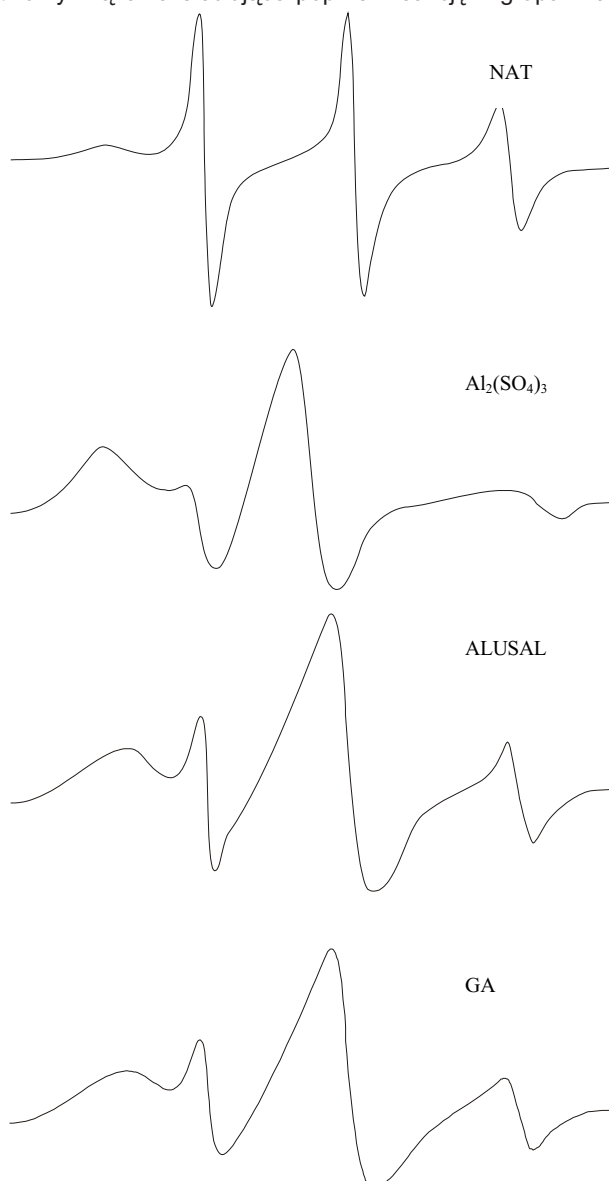
Results and discussion

Typical EPR spectrum of the 4ITCTO spin label incorporated into native porcine pericardium tissue has been presented in FIG.1, showing the lines characteristic for the radicals: fast moving, weakly immobilized (narrow-line hw) and slowly moving, strongly immobilized (broad-line h_s). The analysis of the experimental spectra was performed by the calculation of hw/ h_s ratio, which is very sensitive measure of the physical state of proteins in biological membranes [Gwoździński].

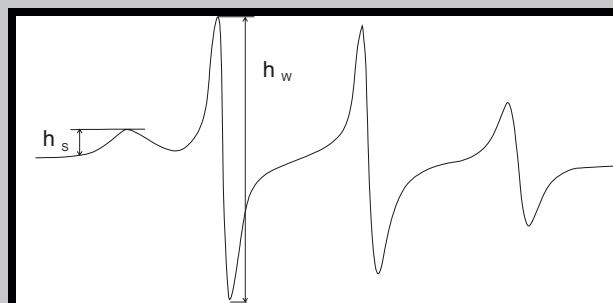
Comparison of the EPR spectra (FIG.2) of the spin label

ślić siłę wiązania znacznika ze składnikami tkanki.

Wyniki prezentowanych badań pokazują, że znacznik spinowy 4ITCTO jest dobrym markerem zmian strukturalnych i dynamicznych, zachodzących w tkankach zawierających kolagen i elastynę. Wartości ilorazu h_w/h_s obliczone z widm EPR rodnika 4ITCTO związanego z tkanką traktowaną $Al_2(SO_4)_3$ ($h_w/h_s=0,5+0,1$), preparatem ALUSAL ($h_w/h_s=5+1$) lub GA ($h_w/h_s=4+1$) są istotnie mniejsze w porównaniu z tkanką natywną ($h_w/h_s=14+2$). Świadczy to o istotnych zmianach struktury modyfikowanych tkanek. Zarówno jony glinu, jak i glutaraldehyd powodują sieciowanie kolagenu. Mechanizmy tych procesów są jednak różne. W przypadku glutaraldehydu, zmniejszenie wartości stosunku h_w/h_s jest spowodowane w głównej mierze spadkiem wartości h_w w efekcie zmniejszenia się liczby miejsc wiążących dostępnych dla znacznika spinowego 4ITCTO. Aldehyd glutarowy tworzy wiązania sieciujące poprzez reakcję z grupami ε -



RYS. 2. Widma EPR znacznika spinowego 4-izotiocyjaniano-TEMPO związanego z tkankami: natywną (NAT) i usieciowanymi za pomocą $Al_2(SO_4)_3$, preparatu ALUSAL oraz GA.
FIG. 2. EPR spectra of the spin label 4-Isothiocyantato-TEMPO attached to the tissues: native (NAT) and cross-linked using $Al_2(SO_4)_3$, ALUSAL preparation and GA.



RYS.1. Widmo EPR znacznika spinowego 4-izotiocyjaniano-TEMPO związanego z tkanką; h_s i h_w - składowe widma odpowiadające znacznikowi wykazującemu odpowiednio małą i dużą ruchliwość.
FIG.1. EPR spectrum of the spin label 4-Isothiocyantato-TEMPO attached to the tissue; h_s and h_w - spectrum-components related to the label indicating low and great mobility, respectively.

4ITCTO incorporated to the porcine pericardium tissues: native and modified by GA or Al^{3+} ions (arising from the sulphate salt or the ALUSAL preparation) permitted evaluation the power of the label binding with the tissue components.

The result of presented investigations show that spin label 4ITCTO is a good marker of structural and dynamic changes taking place in tissues containing the collagen and the elastin. Values of the h_w/h_s ratio calculated from EPR spectra of 4ITCTO radical attached to the tissue treated with: $Al_2(SO_4)_3$ ($h_w/h_s=0,5+0,1$), ALUSAL ($h_w/h_s=5+1$) or GA ($h_w/h_s=4+1$), are essentially lower as compared with the native tissue ($h_w/h_s=14+2$). It points to essential changes in structure of modified tissues. Both aluminium ions and glutaraldehyde cause cross-linking of the collagen. However mechanisms of these processes are different. In case of glutaraldehyde, the decrease in the h_w/h_s ratio is chiefly due to decrease in h_w value, as a result of decrease in number of binding sites accessible for the spin label 4ITCTO. The glutaraldehyde forms cross-linking bonds through the reaction with the ε -amino groups of hydroxylysine and lysine in the collagen, and 4ITCTO forms bonds with the lysine [12]. The blocking by GA of the part of ε -amino groups in the collagen reveals by the counted ratio decrease.

The aluminium ions stabilize the collagen, and probably also the elastin, through formation in the protein structure of very stable, covalent cross-linking bonds between Al^{3+} and carboxyl groups. It means that the h_w/h_s ratio decrease is not caused by lack of the amino acid rests accessible for the spin label. Probably in this case, the shape of 4ITCTO the EPR spectrum being the superimposed EPR signals of the spin label molecules attached to the collagen and the elastin [12] reflects changes in the rotary correlation time of ε -amino groups of these proteins. Cross-linking of the collagen and elastin causes the stiffness enlargement in their structure. This influences the motility of the spin label 4ITCTO attached to suitable amino acids of the tissue proteins. Additional cross-linking bonds make difficult movements of the main collagen chain. It leads to decrease in the motility, thus in elongation of the rotary correlation time of the radical attached with ε -amino groups of the lysine in collagen. As a result, changes in the EPR spectra shape are observed: the broadening of three narrow lines and the EPR spectrum shape similar to this attributed to the radical attached with the elastin. This effect is especially visible in

aminowymi hydroksylizyny i lizyny kolagenu, a 4ITCTO tworzy wiązania z lizyną [12]. Zablokowanie przez GA części grup ϵ -aminowych w kolagenie objawia się zmniejszeniem wartości obliczanego ilorazu.

Jony glinu stabilizują kolagen, a prawdopodobnie także elastynę, poprzez wytworzenie w strukturze białka bardzo trwałych sieciujących wiązań koordynacyjnych między Al^{3+} i grupami karboksylowymi. Oznacza to, że zmniejszenie ilorazu hw/hs nie jest spowodowane niedostatkami reszt aminokwasowych dostępnych dla znacznika spinowego. Prawdopodobnie w tym przypadku kształt widma EPR znacznika spinowego 4ITCTO, będącego superpozycją widm EPR znacznika związanego z kolagenem i elastyną [12], odzwierciedla zmiany czasu korelacji rotacyjnej grup ϵ -aminowych tych białek. Sieciowanie kolagenu i elastyny powoduje zwiększenie sztywności ich struktury. Wpływa to na ruchliwość znacznika spinowego 4ITCTO związanego z odpowiednimi aminokwasami białek tkankowych. Dodatkowe wiązania sieciujące utrudniają ruchy łańcucha głównego kolagenu. Prowadzi to do zmniejszenia ruchliwości, czyli wydłużenia czasu korelacji rotacyjnej rodnika związanego z ϵ -aminowymi grupami lizyny kolagenu. Skutkiem są zmiany kształtu widma EPR znacznika spinowego: poszerzenie trzech wąskich linii i przyjęcie kształtu zbliżonego do widma EPR rodnika związanego z elastyną. Efekt ten jest szczególnie wyraźny w widmie tkanki osierdzia traktowanej $Al_2(SO_4)_3$ i w mniejszym stopniu - preparatem ALUSAL (RYS.2). Składowa reprezentująca rodnik o krótkim czasie korelacji rotacyjnej (duża ruchliwość; trzy wąskie linie) jest bardzo słaba. Jednocześnie obserwuje się poszerzenie całego widma EPR znacznika spinowego związanego z tkanką. Wskazuje to na usztywnienie struktury wewnętrznej modyfikowanej tkanki.

Wniosek

Traktowanie tkanki osierdzia świni jonami glinu (pochodzącymi zarówno z siarczanu glinu(III), jak i z preparatu leczniczego ALUSAL) prowadzi do zwiększenia sztywności struktury wewnętrznej tkanki. Ujawniają to zmiany kształtu widma EPR znacznika spinowego 4-izotiocyaniano-TEMPO (4ITCTO) związanego z tkanką. Jakkolwiek efekt stabilizacji tkanki jonami Al^{3+} jest podobny do uzyskanego z użyciem aldehydu glutarowego, jednak mechanizmy obu procesów sieciowania białek tkankowych są różne.

Podziękowania

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych i Śląską Akademię Medyczną; granty: NN-1-228/05 i NN-2-366/05. Pomiary EPR prowadzono w Katedrze Fizyki Medycznej ŚAM, kierowanej przez dr hab. Barbarę Piławę, prof. ŚAM.

spectrum of the pericardium tissue treated with $Al_2(SO_4)_3$ and in the smaller less degree - with a preparation ALUSAL (FIG.2). The component representing the radical indicating the short rotary correlation time (large motility; three narrow lines) is very weak. Simultaneously we observed broadening of whole EPR spectrum EPR of the spin label attached with the tissue. It points to stiffening of internal structure of the modified tissue.

Conclusion

The treatment of the porcine pericardium tissue with aluminium ions (originating both from the aluminium sulphate, as well as from the therapeutic preparation ALUSAL) leads to enlargement of stiffness of the tissue internal structure. It is visible by the shape changes in the EPR spectra of spin label 4- Isothiocyanato-TEMPO (4ITCTO) attached with the tissue. Although result of the tissue stabilization by Al^{3+} ions is similar to those obtained using the glutaraldehyde, but mechanisms of both processes of the tissue proteins cross-linking are different.

Acknowledgements

This work was financially supported by Committee for Scientific Research (KBN) and Medical University of Silesia; grants: NN-1-228/05 i NN-2-366/05. EPR-measurements have been carried out in Department of Medical Physics (Medical University of Silesia) headed by prof. Barbara Piława.

Piśmiennictwo

References

- [1] Zejc A. Chemia leków. PZWL, Warszawa, 1999.
- [2] Ostrowski K. Histologia. PZWL, Warszawa, 1995.
- [3] Nimni M.E. (Ed.) Collagen. Volume I. Biochemistry. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 2000.
- [4] Stryer L. Biochemia, PWN, Warszawa, 2003.
- [5] Friess W. Collagen - biomaterial for drug delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. 1998, 45: 113-136.
- [6] Khor E. Methods of the treatment of collagenous tissue for bio-protheses. Biomaterials, 1997, 18: 95-105.
- [7] Lasek W. Kolagen. WNT, Warszawa, 1978.
- [8] Gwoździński K., Bartosz G. Synteza i właściwości nitroksylowych znaczników spinowych oraz ich zastosowanie w badaniach błon biologicznych. Zagadnienia Biofizyki Współczesnej, 1978, 3: 45-100.
- [9] Berliner L.J. Spin labeling. Theory and applications. Acad. Press, New York-San Francisco-London, 1976.
- [10] Middleton D.A., Reid D.G., Watts A. The conformations of a functional spin-labelled derivative of gastric H/K-ATPase investigated by EPR spectroscopy. Biochemistry, 1995, 34: 7420-7429.
- [11] Surewicz K.W. Metody interpretacji widm EPR znakowanych spinowo błon biologicznych. Zagadnienia Biofizyki Współczesnej, 1978, 3: 21-44.
- [12] Cwalina B., Dul L. Porcine pericardium crosslinking-effects investigated by EPR spectroscopy - spin labeling method. Engineering of Biomaterials, 2002, 23-25: 61-64.

IMMOBILIZACJA GENTAMYCYN NA NOŚNIKACH HYDROKSY- APATYTOWYCH W CELU NADANIA IM WŁASNOŚCI ANTYBAKTERYJNYCH

BELCARZ A.*, ZALEWSKA J.*, GINALSKA G.*, ŚLÓSARCZYK A.**

*KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII, AKADEMIA MEDYCZNA, 20-950
LUBLIN, POLSKA

**KATEDRA TECHNOLOGII I CERAMIKI, AKADEMIA GÓRNICZO-
HUTNICZA, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),34-36]

Porowaty hydroksyapatyt (HA) stanowi doskonały syntetyczny substytut kości używany w chirurgii kości i powiększeniach twarzoczaszki (Cottrell & Wolford, 1998) ze względu na swoją biokompatybilność i osteoprzewodnictwo. Według Holmesa, w okresie 5-16 miesięcy po operacji około 50% implantu zostaje zastąpionych przez tkanki kostne lub miękkie (Holmes et al., 1988). Aktualne statystyki podają, że odpowiednio w 2% lub 4% przypadków operacji biodra lub kolana wywołują się infekcje, ale liczby te zwiększają się do 50% w przypadkach użycia zewnętrznych stabilizatorów złamań (Stigter et al., 2002). Przyczyną tych zjawisk jest słaba dostępność zainfekowanych obszarów kości przez systemowo dostarczane antybiotyki. Pożądaną alternatywą tej terapii jest zatem antybiotykowa terapia miejscowa, pozwalająca na lokalne kontrolowane dostarczanie antybiotyku do zakażonego miejsca. W tym celu antybiotyki wprowadzane są zazwyczaj do cementu hydroksyapatytowego poprzez fizyczną inkorporację do nośnika (Stigter et al., 2002; Buranapanitkit et al., 2004; Joosten et al., 2004, 2005; Baro et al., 2002).

Głównym celem pracy było antybakteryjne zabezpieczenie HA poprzez jego fizyczno-chemiczne wiązanie z gentamycyną.

Procedura immobilizacji antybiotyku została przeprowadzona według zgłoszenia patentowego (Ginalska, 2003). Aktywację HA γ -aminopropyltrietyloksysilanem przeprowadzono według procedury Weethala (1976), a keratynę przyłączyła do kowalencyjnie do silanizowanych HA według procedury własnej. Stężenie gentamycyny określano metodą spektrofotometryczną według metody Frutos Cabanillas (2000). Cechy nośników hydroksyapatytowych (uzyskanych z Katedry Technologii i Ceramiki, AGH w Krakowie) podano w TABELI I. Wynika z niej, że im niższa temperatura ich syntezy, tym mniejsza jest gęstość nośników, a większa ich porowatość i ilości keratyny związanej na powierzchni.

Wyniki immobilizacji gentamycyny na HA prezentuje TA-

GENTAMICIN IMMOBILIZATION ON HYDROXYAPATITE CARRIERS FOR INCREASING THEIR ANTIBACTERIAL PROPERTIES

BELCARZ A.*, ZALEWSKA J.*, GINALSKA G.*, ŚLÓSARCZYK A.**

*CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY
OF LUBLIN, 20-950 LUBLIN, POLAND

**CHAIR OF TECHNOLOGY AND CERAMICS, AGH UNIVERSITY OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY, 30-059 KRAKÓW, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),34-36]

Porous hydroxyapatite (HA) is an excellent synthetic bone substitute used in orthognathic surgery and craniofacial augmentation (Cottrell & Wolford, 1998) for its biocompatibility and osteoconductivity. According to Holmes, within a postoperative period of 5 - 16 months about 50% of a whole implant is usually replaced by bone or soft tissues (Holmes et al., 1988). Recent statistics estimate the current incidence of infections to be around 2% and 4% in total hip and knee arthroplasties, respectively, but these figures can increase to 50% when external fracture fixators are used in trauma surgery (Stigter et al., 2002). The reason lies in a poor accessibility of the bone-infected site by systematically delivered antibiotic. The local therapy is therefore a desired alternative, allowing for a control delivery of antibiotics to infected sites. For this purpose, antibiotics are usually introduced to hydroxyapatite cement via their physical incorporation to the carrier (Stigter et al., 2002; Buranapanitkit et al., 2004; Joosten et al., 2004, 2005; Baro et al., 2002).

Main aim of the research was the obtaining of antibacterial protection of HA via its physico-chemical binding with gentamicin.

Immobilization procedure was performed according to our Patent pending (Ginalska, 2003). HA was activated by γ -aminopropyltriethoxysilane according to Weethal's method (1967), keratin was covalently immobilized to silanized HA according to our own procedure. Gentamicin concentration was estimated spectrophotometrically after Frutos Cabanillas (2000). Properties of hydroxyapatite carriers (obtained from Chair of Technology and Ceramics, AGH, Kraków) are presented in TABLE I. The data lead to the conclusion that the lower is HA synthesis temperature, the lower is HA density but the higher carrier porosity and amount of keratin immobilized on its surface.

Results of gentamicin immobilization on HA are presented in TABLE II. Temperature of HA synthesis exerts a significant effect on amount of the antibiotic retained on the car-

Nośnik Carrier	Temp. syntezy Synthesis temp. °C	Porowatość otwarta Open porosity (%)	Gęstość pozorna Apparent density (g/cm ³)	Porowatość całkowita Total porosity (%)	Średni rozmiar porów Average pore diameter (µm)	Ilość keratyny mg/g HA Amount of keratin mg/g of HA
I	800	67,0	1,017	72,6	0,09	16,29
II	900	66,5	1,040	71,5	0,18	8,304
III	1000	59,8	1,265	62,9	0,25	7,356
IV	1050	44,6	1,676	-	-	3,444
V	1100	36,9	1,987	-	-	2,976
VI	1150	29,6	2,192	32,8	0,43	2,094

TABELA I. Częściowa charakterystyka nośników hydroksyapatytowych (HA).

TABLE I. Partial characteristics of hydroxyapatite carriers (HA).

rier - the higher it is the less gentamicin binds to hydroxyapatite. The highest amounts of antibiotics retained (by physical adsorption, ionic interactions and covalent bonds) on

Nośnik Carrier	Silanizowany Silanized			Pokrywany keratyną Keratin-sealed			Nie modyfikowany (kontrola) Non-modified (control)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
I	2,364	1,828	1,828	2,500	1,326	1,187	1,628	0,727	0,558
II	1,478	1,026	1,026	2,458	1,639	1,577	1,136	0,404	0,392
III	1,342	1,035	0,997	1,608	0,951	0,811	1,028	0,445	0,411
IV	1,152	0,985	0,952	1,444	1,155	0,958	0,558	0,388	0,355
V	1,384	1,040	0,915	1,532	0,920	0,645	0,348	0	0
VI	0,928	0,570	0,501	0,232	0	0	0,226	0	0

TABELA II. Ilość gentamycyny unieruchomionej na modyfikowanych i kontrolnych nośnikach HA (mg/g nośnika). A-całkowita; B-związana jonowo i kowalencyjnie; C-związana kowalencyjnie.

TABLE II. Gentamicin amount immobilized on modified and control HA carriers (mg/g carrier). A-total; B-ionically and covalently bound; C-covalently bound.

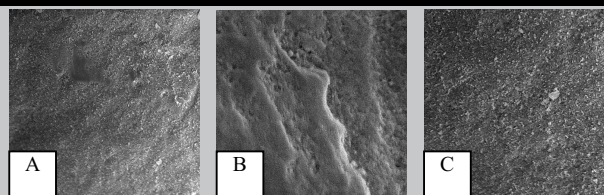
BELA II. Temperatura syntezy hydroksyapatytów wywiera wyraźny wpływ na ilość zatrzymanego na nośniku antybiotyku - im jest większa, tym mniej gentamycyny wiąże się do HA. Największe całkowite ilości antybiotyku zatrzymanego (przez adsorpcję fizyczną, wiązania jonowe i kowalencyjne) na nośniku - do 2,5 mg/g HA - stwierdzono dla nośników pokrywanych keratyną w porównaniu z silanizowanymi czy kontrolnymi (z wyjątkiem HA VI). Ilości gentamycyny związanej kowalencyjnie są generalnie porównywalne dla HA silanizowanych i białkowanych i sięgają nawet do 1,8 mg/g HA. Ilość jonowych połączeń antybiotyk-HA jest znaczna dla nośników keratynowanych, a praktycznie brak ich w przypadku HA silanizowanych.

Powyższe obserwacje potwierdzone zostały przez wyniki zahamowania wzrostu *E. coli* (ATCC 25922) przez hydroksyapatyty zawierające gentamycynę całkowitą lub też związaną jonowo i kowalencyjnie (Tabela III). Wielkość zon inhibicji wzrostu *E. coli* jest tym większa, im niższa jest temperatura syntezy HA. Zauważalny jest pozytywny wpływ obecności keratyny na ilość wiązań jonowych pomiędzy antybiotykiem a zmodyfikowanym nośnikiem - nawet dla nośnika spiekane w temp. 1150°C ich obecność wywołuje znacznie większą inhibicję wzrostu *E. coli* niż nośniki silanizowane lub nieaktywowane (kontrolne).

Kolejne doświadczenia wykonywano z użyciem nośnika HA I, dla którego uzyskano najlepsze wyniki immobilizacji gentamycyny. Zdjęcia SEM hydroksyapatytu I (800°C) wykazały, że modyfikacja nośnika silanem nie zmienia jego struktury powierzchniowej w porównaniu z kontrolą (RYS.1). Natomiast na nośniku modyfikowanym keratyną zauważa się obecność włókien keratyny pokrywających nośnik.

Nośnik HA I przechowywano przez 4 miesiące w temperaturze pokojowej w celu sprawdzenia długotrwałej aktywności antybakteryjnej tak modyfikowanych hydroksyapatytów. Stwierdzono, że HA I zachował swoje antybakteryjne właściwości wobec *E. coli*, co widać najlepiej dla próbek zawierających gentamycynę związaną poprzez wszystkie trzy typy oddziaływań. Działanie gentamycyny związanej jonowo jest najsilniejsze w przypadku HA keratynowanego, zaś wpływ inhibujący antybiotyku związanego kowalencyjnie w warunkach testowych obserwowany jest w bezpośrednim kontakcie HA z bakteriami (RYS.2).

Reasumując: wykazano, że immobilizacja gentamycyny na nośnikach hydroksyapatytowych wiąże się z występowaniem trzech typów oddziaływań: biernej adsorpcji, sił jonowych i wiązań kowalencyjnych. Ilość gentamycyny związanej przez HA jest tym większa, im niższa jest temperatura jego syntezy. Ilość antybiotyku związanej z HA jonowo jest wyraźnie największa w przypadku modyfikacji nośnika keratyną. Modyfikowane hydroksyapatyty nie tracą swych antybakteryjnych właściwości po 4 miesiącach przechowywania w temperaturze pokojowej.



RYS.1. Zdjęcia SEM (x2000) nośników HA I (800°C) silanizowanych (A) lub pokrywanych keratyną (B) ze związaną gentamycyną. HA nieaktywowany stanowi kontrolę (C).

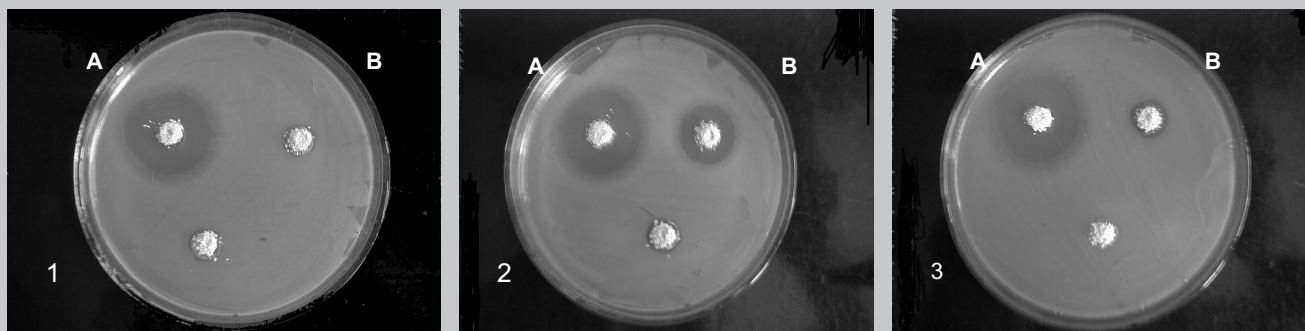
FIG. 1. SEM photographs (x 2000) of HA carriers silanized (A) or keratin-sealed (B) with immobilized gentamicin. Non-activated HA I (800°C) (C) serves as control.

carrier - up to 2.5 mg/g HA - were found for keratin-sealed carriers when compared with silanized or control ones (except of HA VI). Amounts of gentamicin covalently bound are generally comparable for HA silanized and protein-coated; they reach up to 1.8 mg/g HA. Amount of ionic antibiotic-HA interactions is significant for keratin-sealed carriers, but practically undetectable in case of silanized HA. The above observations were confirmed by results of inhibition of *E. coli* (ATCC 25922) growth by HA with total gentamicin or HA with ionically and covalently bound antibiotic (Table III). The dimensions of *E. coli* growth inhibition zones are the bigger, the lower is HA synthesis temperature. Positive effect of keratin presence on amount of ionic interactions between the antibiotic and modified carrier is noticeable. Even for HA VI, synthesized at 1150°C, their presence results in much more significant inhibition of *E. coli* growth than for silanized or non-activated (control) carrier. Further experiments were performed on HA I because the best results of gentamicin immobilization were obtained for this carrier. SEM micrographs of HA I (800°C) showed that modification of hydroxyapatite by γ -aminopropyltriethoxysilane does not change its surface structure when

Nośnik Carrier	Silanizowany Silanized		Pokrywany keratyną Keratin-sealed		Nie modyfikowany (kontrola) Non-modified (control)	
	A	B	A	B	A	B
I	33,5	19	34	22,5	32	24,5
II	31	14	31	21	32	20
III	29	11	28	18	29	14
IV	25,5	12,5	30	19,5	25	0
V	27	16	27	20,5	27	0
VI	28,5	10	26	17	26	0

TABELA III. Strefy zahamowania wzrostu (w mm) *E. coli* na płytkach z podłożem Mueller-Hinton jako efekt działania gentamycyny unieruchomionej na nośnikach HA (50 mg). Nośniki zawierały gentamycynę całkowitą (A) i związaną jonowo i kowalencyjnie (B).

TABLE III. Zones of *E. coli* growth (mm) on Mueller-Hinton agar plates as a function of gentamicin immobilized on HA carriers (50 mg) activity. The carriers contained the total gentamicin (A) and the ionically and covalently bound (B).



RYS. 2. Strefy zahamowania wzrostu *E. coli* na płytkach z podłożem Mueller-Hinton jako efekt działania gentamycyny unieruchomionej na nośniku HA I (50 mg) po 4 miesiącach przechowywania w R/T. Nośniki zawierały gentamycyną całkowitą (A), związaną jonowo i kowalencyjnie (B) oraz związaną kowalencyjnie (C). 1-HA silanizowany, 2-HA pokrywany keratyną, 3-HA nieaktywowany (kontrolny).

FIG. 2. Zones of *E. coli* growth inhibition on Mueller-Hinton agar plates as a function of gentamicin immobilized on HA I carrier (50 mg) activity after 4 months of storage at R/T. The carriers contained the total gentamicin (A), ionically and covalently bound gentamicin (B) and covalently bound gentamicin (C). 1-HA silanized, 2- HA keratin-sealed, 3-HA non-activated (control).

compared with control HA (FIG.1). However, the presence of protein fibers is well visible on surface of keratin-sealed hydroxyapatite.

The HA I carrier was stored for 4 months at room temperature in order to test the long-lasting antibacterial activity of such modified hydroxyapatite. It was found that HA I remained active against *E. coli* after this period; the most significant antibacterial activity of this carrier is observed for samples containing gentamicin bound via all three types of interactions. Activity of ionically bound gentamicin was the highest for keratin-sealed HA. In the experiment conditions, the inhibiting effect of covalently bound antibiotic was observed upon direct contact with bacterial cells (FIG.2).

To sum up: It was shown that gentamicin binds on hydroxyapatite carriers due to appearance of three types of interactions: passive adsorption, ionic interactions and covalent bonds. Amount of gentamicin bound to HA is the higher, the lower is temperature of HA synthesis. Amount of antibiotic ionically bound to HA is the highest in case of keratin-sealed carrier. The modified hydroxyapatites retain their antibacterial activities after 4 months of storage at room temperature.

Piśmiennictwo

- [1] Baro M., Sanchez E., Delgado A., Perera A., Evora C. In vitro and in vivo characterization of gentamicin bone implants. *J. Contr. Release* 83 (2002), 353-364.
- [2] Buranapanitkit B., Srinilta V., Ingving N., Oungbho K., Geater A., Ovatlarnporn C. The efficacy of a hydroxyapatite composite as a biodegradable antibiotic delivery system. *Clin. Orthopaedics Rel. Res.* 424 (2004), 244-252.
- [3] Cottrell D. A. & Wolford L. W. Long-term evaluation of the use of coralline hydroxyapatite in orthognathic surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 56 (1998), 935-942.
- [4] Frutos Cabanillas P., Diez Pena E., Barrales-Rienda J. M., Frutos G. Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release. *Int. J. Pharm.* 209 (2000), 15-26.
- [5] Ginalska G., Uryniak A., Łobarzewski J., Osińska M. A method of antibiotics immobilization. Polish Patent no P-358934 (2003).

References

- [6] Holmes R. E., Wardrop R. W., Wolford L. M. Hydroxyapatite as a bone graft substitute in orthognathic surgery: Histologic and histometric findings. *J. Oral Maxillofac Surg.* 46 (1988), 661-671.
- [7] Joosten U., Joist A., Frebel T., Brandt B., Diederichs S., von Eiff C. Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: Studies in vitro and in vivo. *Biomaterials* 25 (2004), 4287-4295.
- [8] Joosten U., Joist A., Gosheger G., Liljenqvist U., Brandt B., von Eiff C. Effectiveness of hydroxyapatite-vancomycin bone cement in the treatment of *Staphylococcus aureus* induced chronic osteomyelitis. *Biomaterials* 26 (2005), 5251-5258.
- [9] Stigter M., de Groot K., Laroye P. Incorporation of tobramycin into biomimetic hydroxyapatite coating on titanium. *Biomaterials* 23 (2002), 4143-4153.
- [10] Weethal H. Covalent coupling methods for inorganic support material. *Methods Enzymol.* 44 (1967), 134-148.

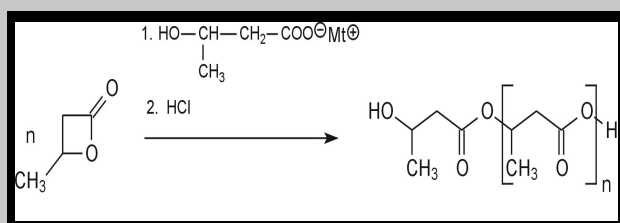
NOWE NANOPOLIMERY - ZASTOSOWANIE JAKO NOŚNIKI LEKÓW W MEDYCYNIE

ZBIGNIEW JEDLIŃSKI

CENTRUM CHEMII POLIMERÓW, POLSKA AKADEMIA NAUK,
UL. M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE 34, 41-819 ZABRZE,
ZBIGNIEW.JEDLINSKI@SERVER.CCHP-PAN.ZAB

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),37-38]

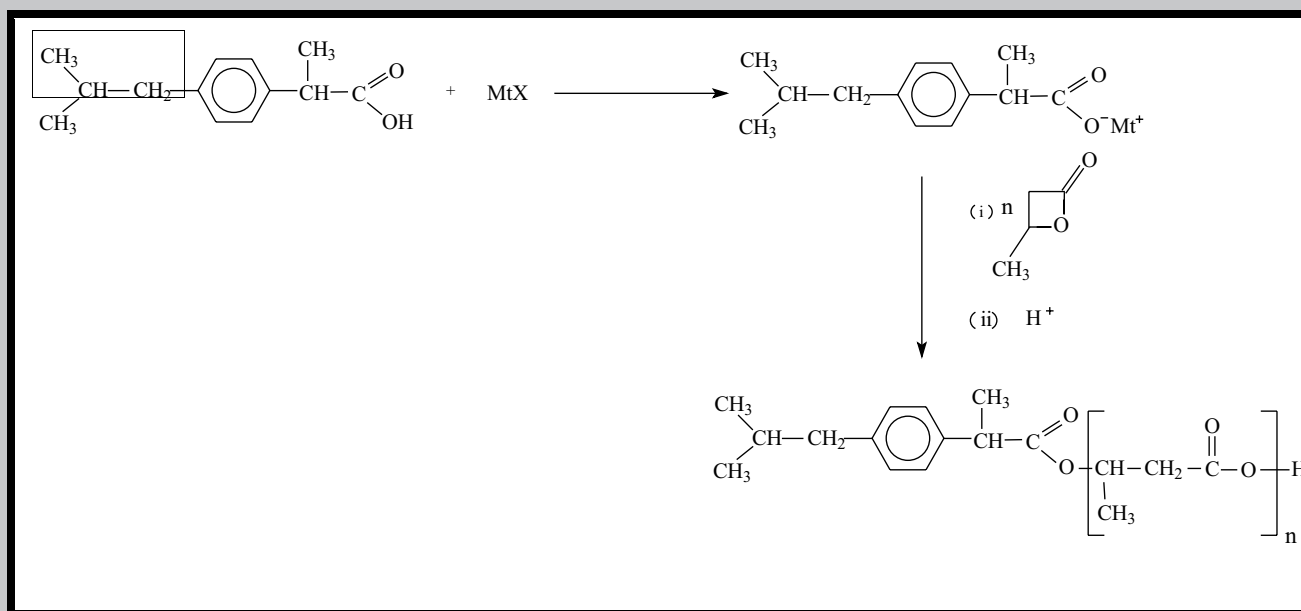
Wiele syntetycznych i naturalnych polimerów proponuje się jako materiały do zastosowań w medycynie oraz w inżynierii tkankowej [1]. Duncan i Kopeček zaproponowali jako nośników leków w chemoterapii [2] kilka syntetycznych jak też naturalnych polimerów. Jednakże okazało się, że wiele naturalnych materiałów polimerowych, np. polihydroksymaślan (PHB) produkowany przez kolonie bakteryjne, zawiera-



SCHEMAT 1.
SCHEME 1.
(where: $Mt^+ = Na^+$ solvent = DMSO, DMF)

ra małe ilości toksycznych protein i lipidów (ca 2.5%), i z tych względów nie mogą być użyte w medycynie, w szczególności jako nośniki leków [3].

Wybitny szwajcarski chemik organik D. Seebach [4] z Zurychu opracował syntezę polihydroksymaślanu (PHB) stosując metodę stopniowej kondensacji kwasu (R)-3-hydroksymaślowego. Jednakże metoda ta była czasochłonna i mało wydajna.



W naszym laboratorium opracowano nowy typ anionowej polimerizacji z otwarciem pierścienia β -butyrolaktonu stosując nowy układ katalityczny. W układzie tym zastosowano polarne rozpuszczalniki takie jak dimetylosulfotlenek

NOVEL NANOPOLYMERS - USEFUL DRUG CARRIERS FOR MEDICAL APPLICATIONS

ZBIGNIEW JEDLIŃSKI

CENTRE OF POLYMER CHEMISTRY, POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
34, M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE ST., 41-819 ZABRZE, POLAND
ZBIGNIEW.JEDLINSKI@SERVER.CCHP-PAN.ZABRZE.PL

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),37-38]

Many synthetic and natural polymers were suggested as materials in medical application particularly in tissue engineering [1]. Some synthetic as well as natural polymers were proposed also by Duncan and Kopeček as drug carriers in chemotherapy [2]. However it turned out that some of these materials, e.g. polyhydroxybutyrate (PHB) produced in bacterial cells, contain small amount of toxic proteins and lipids (ca 2.5%) and can not be used in medical applications particularly as drug carriers [3].

Therefore, the excellent organic chemist, D. Seebach [4] from Zurich, developed multistep condensation method of (R)-3-hydroxybutyric acid syntheses yielding corresponding polymer of PHB without any toxic ingredients. However, the yields of such step by step polycondensation method were low. We have developed novel type of anionic polymerization based on the ring-opening polymerization of β -butyrolactone using specific catalyst and polar solvents as dimethyl sulfoxide (DMSO) or dimethylformamide (DMF) as shown in the SCHEME 1.

This method we are able to produce nanopolymers of 3-hydroxybutyric acid, which is non-toxic, well defined and useful for medical applications [5].

This approach is very useful particularly in the case of modifications of anti-inflammatory drugs (NSAIDs). It turned out that these novel patented by our group "tailor made" nanopolymers of 3-hydroxybutyric acid can be used as drug carriers of several non-steroidal, anti-inflammatory drugs e.g. ibuprofen, aspirin etc. The next step is reaction with some classical anti-inflammatory and anticancer drugs. In

SCHEMAT 2.
SCHEME 2.
(where: $Mt=Na$, K ; $X = H, OH$, $n=3\div 5$)

37

(DMSO) i dimetyloformamid (DMF) zdolne do aktywowania anionów. Przebieg reakcji przedstawiono na SCHEMACIE 1.

Tą metodą otrzymano nanopolimery kwasu 3-hydroksymasłowego, które są nietoksyczne, o założonej i dobrze zdefiniowanej strukturze, mogące znaleźć zastosowanie w medycynie [5].

Nanopolimery kwasu 3-hydroksymasłowego szczególnie mogą być bardzo użyteczne w przypadku zastosowania ich jako nośników niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Opracowano metodę otrzymywania koniugatów niesteroidowych leków przeciwzapalnych takich jak ibuprofen, aspiryna z nanopolikwasem 3-hydroksymasłowym. Na SCHEMACIE 2 przedstawiono syntezę koniugatu ibuprofenu z nanopolimerem kwasu 3-hydroksymasłowego.

Wyniki naszych badań wykazują, że reakcja β -butyrolaktonu z ibuprofenem zachodzi z regioselektywnym otwarciem pierścienia laktonu i utworzeniem wiązania chemicznego z ibuprofenem.

Upřednio produkowane leki z grupy koksibów, będące inhibitorami cyklooksygenazy 2 (COX-2), takie jak Vioxx (rofekoksib, produkowany przez Merck'a) i Bextra (valdekoksib, produkowany przez Pfizer'a) okazały się silnie toksyczne. Zostały one wycofane przez FDA (Food Drug Administration) ze względu na duże działania uboczne głównie kardiotoxyczne, prowadzące do śmierci pacjentów.

Stosując metody opracowane w naszym laboratorium mamy nadzieję zastosować nietoksyczne nanopolimery (kwasu 3-hydroksymasłowego) jako nośniki leków.

Takie nośniki są uniwersalne i mogą być wykorzystane jako nośniki niesteroidowych leków przeciwzapalnych (takich jak ibuprofen, aspiryna etc.), cytostatyków i innych. Wyniki badań biologicznych in vitro na linach komórkowych i badań in vivo na zwierzętach modyfikowanych leków nanopolimerem są bardzo obiecujące i potwierdzają możliwość ich zastosowania w medycynie.

Przedstawione metody otrzymywania nowych nanopolimerów i użycie ich jako nośników niesteroidowych leków przeciwzapalnych może znaleźć praktyczne zastosowanie, ponieważ produkcja dwóch niesteroidowych leków przeciwzapalnych z grupy koksibów Bextra (Pfizer) i Vioxx (Merck), inhibitorów COX-2, została w oparciu o decyzję amerykańskiej FDA wstrzymana.

Podziękowanie

Polski grant nr PBZ-KBN-082/T08/02

MODYFIKACJA IBUPROFENU NANOPOLIMEREM KWASU 3-HYDROKSYMASŁOWEGO

ZBIGNIEW JEDLIŃSKI, IZABELA BOSEK,
MARIA JUZWA, ALEKSANDRA RUSIN

CENTRE OF POLYMER CHEMISTRY, POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
34, M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE STR. ZABRZE, POLAND
ZBIGNIEW.JEDLINSKI@CCHP-PAN.ZABRZE.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 47,(2005),38-39]

Wiele polimerów stosuje się w systemach dostarczania leków celem poprawienia skuteczności działania, zmniejszenia działań ubocznych i toksyczności, a także poprawienie komfortu sposobu dawkowania w porównaniu z le-

the SCHEME 2 the reaction β -butyrolactone with ibuprofen is presented.

The results of the present study have revealed that in the reaction of β -butyrolactone with ibuprofen the regioselective ring opening and oligomerization of β -butyrolactone take places and drug-polymer conjugates are formed.

As you probably know anti-inflammatory drugs used as COX-2 inhibitors e.g. Vioxx (produced by Merck) or Bextra (produced by Pfizer) showed very strong side effects and toxicity. Therefore their production has been cancelled according to the decision of FDA (Food Drug Administration). Using novel approach and novel drug carriers which were discovered recently in our laboratory we hope to overcome these difficulties using novel nanopolyhydroxybutyrate acids as drug carriers.

These carriers are very versatile and can be used with various anti-inflammatory drugs such as ibuprofen, aspirin and others well known anti-inflammatory drugs. The biochemical in vitro tests using various novel bacterial and in vivo tests showed very promising novel results in medical treatment employing these novel nanopolymers.

The methods of production of novel nanopolymers used as anti-inflammatory drug carriers, particularly in oncology, presented here are very important, because the production of two anti-inflammatory drugs from the group of coxibs as Bextra (produced by Pfizer) and Vioxx (produced by Merck) as COX-2 inhibitors has been recently cancelled. Therefore many attempts are underway to produce novel non-toxic drug carriers for clinical testing.

Acknowledgement

Polish grant number PBZ-KBN-082/T08/02

Piśmiennictwo

References

- [1] Jedliński Z., Kurcok P., Lenz R. W.: *Macromolecules*. 3, (1998), 6718.
- [2] Thanou M., Duncan R.: *Drugs* 4 (6), (2003), 701.
- [3] Zinn M., Witholt B., Egli T.: *Advan. Drug Deliv. Rev.* 53, 5 (2001)
- [4] Seebach D., Fritz M. G.: *Int. J. Biol. Macromol.* 25, 217-236 (1999).
- [5] Piddubnyak V., Kurcok P., Matuszowicz A., Głowala M., Fiszer-Kierzkowska A., Jedliński Z., Juzwa M., Krawczyk Z.: *Biomaterials* 25, 5271 (2004).

MODIFICATION OF IBUPROFEN USING NANOPOLYMERS OF 3-HYDROXYBUTYRIC ACID

ZBIGNIEW JEDLIŃSKI, IZABELA BOSEK,
MARIA JUZWA, ALEKSANDRA RUSIN

CENTRE OF POLYMER CHEMISTRY, POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
34, M. SKŁODOWSKIEJ-CURIE STR. ZABRZE, POLAND
ZBIGNIEW.JEDLINSKI@CCHP-PAN.ZABRZE.PL

[Engineering of Biomaterials, 47,(2005),38-39]

Many drug-polymer delivery systems have been proposed offering improved efficacy, reduced toxicity and better patient compliance compared with conventional administration forms of drugs. Various synthetic and natural poly-

kiem niezmodyfikowanym. Różne syntetyczne i naturalne polimery mogą być użyte w tych systemach [1,2]. Jednakże wiele zaproponowanych nośników polimerowych nie spełnia wymagań, bo nie są biokompatybilne i biodegradowalne oraz zawierają toksyczne domieszki.

Poszukując biodegradowalnych i biokompatybilnych nietoksycznych polimerów, mogących znaleźć zastosowanie w systemach dostarczania leków (DDS), opracowano syntezę nietoksycznego biokompatybilnego nanopolimeru kwasu 3-hydroksymasłowego zawierającego kilka merów w łańcuchu polimerowym [3].

W naszym laboratorium opracowano kilka metod modyfikacji leków polimerami, otrzymując koniugaty lek-polimer zawierające syntetyczny nanopolimer (kwas 3-hydroksymasłowy) jako nośnik polimerowy. Szczególną uwagę zwrócono na modyfikację niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). Przeprowadzone badania wykazały, że reakcja β -butyrolaktonu z ibuprofenem zachodzi z regioselektywnym otwarciem pierścienia laktonu i polimeryzacją β -butyrolaktonu z utworzeniem koniugatu lek-polimer.

Struktura otrzymanych koniugatów ibuprofenu z nanopolimerem (kwasem 3-hydroksymasłowym) była badana następującymi metodami: chromatografią żelową (GPC), magnetycznym rezonansem jądrowym (^1H NMR, ^{13}C NMR), spektrometrią masową (ESI-MS) i spektroskopią w podczerwieni (FT-IR).

Badania biologiczne wykazały, że zmodyfikowany ibuprofen nanopolimerem (kwasem 3-hydroksymasłowym) wykazał niższą toksyczność niż czysty lek. Właściwości chemoprewencyjne otrzymanych koniugatów ibuprofenu z nanopolimerem (kwasem 3-hydroksymasłowym) określano metodą *in vitro* badając proliferację linii komórkowych HT29 (ludzki gruczolakorak jelita grubego) i HCT116 (ludzki rak jelita grubego) stosując test MTT. Dalsze badania przydatności zmodyfikowanego naszej metodą ibuprofenu w medycynie są w toku, obecnie są prowadzone badania *in vivo*.

Podziękowanie

PPolski grant nr PBZ-KBN-082/T08/02

STRUKTURA KOMPOZYTÓW NA BAZIE STALI IMPLANTACYJNEJ 316L Z DODATKIEM PIROFOSFORANU WAPNIA

MAŁGORZATA GRĄDZKA-DAHLKE, JAN R. DĄBROWSKI,
BOGDAN DĄBROWSKI

WYDZIAŁ MECHANICZNY,
POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA W BIAŁYMSTOKU

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),39-42]

Wprowadzenie

Stale austenityczne należą do grupy najczęściej stosowanych biomateriałów metalicznych ze względu na połączenie wielu cech, decydujących o użyteczności: dobrych właściwości mechanicznych, plastyczności, łatwości obróbki z dobrą odpornością korozyjną i niską ceną [1]. Tym niemniej

mers have been used in these systems [1,2]. However many proposed polymer carriers are not biocompatible and not biodegradable.

Looking for biodegradable and biocompatible no-toxic polymers used in drug delivery systems (DDS) we performed syntheses of non-toxic biocompatible nanopolymers of 3-hydroxybutyrate containing few monomer units [3].

Several methods of drug modifications were studied in our laboratory, and new drug-polymer conjugates containing synthetic oligo(3-hydroxybutyrate) as polymeric carrier were synthesized. Special attention has been paid to modifications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The results of the present study have revealed that in the reaction of β -butyrolactone with ibuprofen the regioselective ring opening and oligomerization of β -butyrolactone takes place and drug-polymer conjugates are formed.

The structure of synthesized compounds was controlled by GPC and confirmed by elemental analysis, ^1H NMR, ^{13}C NMR, ESI-MS, FT-IR spectra.

The obtained modified ibuprofen has shown prolonged activity and lower toxicity than the drug (ibuprofen) itself. To assess the chemopreventive potential of this novel compound against colon cancer, the biological testing was performed *in vitro* determining the viability of HT29 cell line (colon adenocarcinoma) and HCT116 (colon carcinoma) by MTT assay. Further studies on the usefulness of the modified ibuprofen for medical applications, including *in vivo* tests are underway.

Acknowledgement

Polish grant number PBZ-KBN-082/T08/02

Piśmiennictwo

- [1] Uchrich, K.; Cannizzaro, S. M.; Langer, R. S.; Shakesheff, K. M.: *Chem. Rev.* 99, (1999), 3189.
- [2] Jedliński, Z., Kurcok, P., Lenz, R. W.: *Macromolecules* 31, (1998), 6718.
- [3] Piddubnyak V., Kurcok P., Matuszowicz A., Głowala M., Fisz-Kierzkowska A., Jedliński Z., Juzwa M., Krawczyk Z.: *Biomaterials* 25, (2004), 5271.

References

THE ESTIMATION OF THE PROPERTIES OF IMPLANT Co-Cr-Mo-ALLOY BASED COMPOSITES

MAŁGORZATA GRĄDZKA-DAHLKE, JAN R. DĄBROWSKI,
BOGDAN DĄBROWSKI

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,
BIALYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),39-42]

Introduction

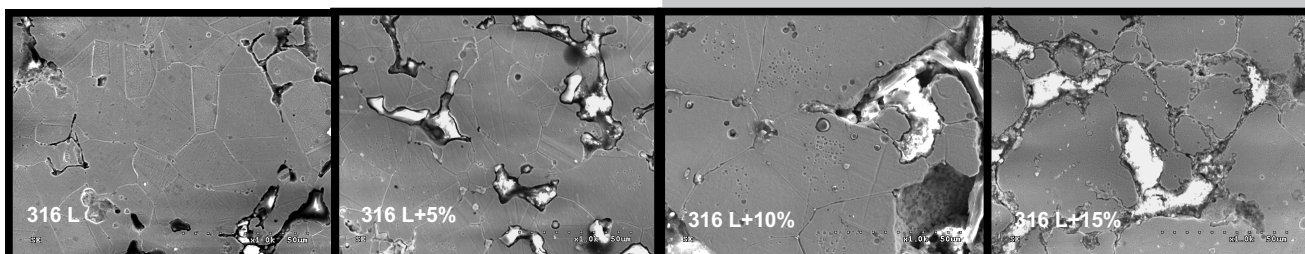
Austenitic stainless steel is one of the most frequently used metallic biomaterials considering a good combination of useful virtues, such as mechanical strength, ductility, fabrication response, corrosion resistance and cost effectiveness [1]. However, it has been observed continuous devel-

obserwuje się ciągły rozwój badań, mających na celu poprawę właściwości materiałów implantacyjnych [2]. Jednym ze sposobów modyfikacji jest zastosowanie materiału kompozytowego o korzystnych właściwościach użytkowych. W pracy przedstawiono wyniki badań struktury i wybranych właściwości mechanicznych materiałów kompozytowych na bazie stali austenitycznej 316L z dodatkiem pirofosforanu wapnia. Wyboru modyfikatora dokonano na podstawie wcześniejszych badań modelowych [3,4].

Materiały i metodyka badań

Badano materiały kompozytowe na bazie spieków z proszków stali implantacyjnej 316L z dodatkiem pirofosforanu wapnia. Przygotowano kompozyty z 5, 10 i 15% objętościowym udziałem modyfikatora. Materiały wykonano metodą MP. Proces technologiczny obejmował prasowanie jednostronne i spiekanie. Wartości nacisków przy prasowaniu wynosiły 600MPa. Spiekanie prowadzono w temperaturze 1150°C w atmosferze argonu.

Badano wpływ zawartości modyfikatora na strukturę i właściwości mechaniczne otrzymanych kompozytów. Zgłady trawiono uniwersalnym odczynnikiem do stali austenitycznych. Obserwacje mikrostruktur przeprowadzono na elektronowym mikroskopie skaningowym HITACHI S-3000N, z analizatorem składu chemicznego EDS - VANTAGE firmy NORAN. Ocenę właściwości wytrzymałościowych przeprowadzono podczas próby ściskania statycznego na maszynie wytrzymałościowej INSTRON 8502.



RYS. 1. Wpływ zawartości pirofosforanu wapnia na zagęszczalność spieków ze stali 316L .
FIG. 1. The influence of calcium pyrophosphate volume fraction on compactibility of 316L steel based composite.

Wyniki badań i dyskusja

Mikrostruktury badanych materiałów przedstawiono na RYS.1 i 2. Na obrazie mikroskopowym czystego spieku z proszku stali 316L widoczne są ziarna austenitu i nieliczne pory.

Natomiast w strukturze kompozytu na bazie stali 316L z dodatkiem pirofosforanu wapnia można zaobserwować znaczne zmiany, powstałe wskutek oddziaływania składników stopowych podczas procesu spiekania. Oprócz ziarn metalicznej osnowy kompozytu i modyfikatora w porach spieku widoczne są wydzielenia nowych faz, zarówno na granicach jak też w obrębie ziarn austenitu. Przy czym wraz ze wzrostem udziału objętościowego dodatku $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ wzrosła ilość wydzieleni faz w strukturze kompozytu. Skład chemiczny poszczególnych faz dla spieku z 15% dodatkiem modyfikatora zestawiono w TABELI 1. Na RYS.3 pokazano porównawcze spektrogramy dla spieku niemodyfikowanego oraz osnowy kompozytu z 15% zawartością pirofosforanu wapnia. Natomiast na kolejnym rysunku - przykładowe wyniki mikroanalizy rentgenowskiej dla zidentyfikowanych faz. Analiza przedstawionych spektrogramów (RYS.4) oraz rozmieszczenia pierwiastków stopowych na powierzchni zgładu próbek kompozytowych (RYS.5) wskazuje, że pod-

opment of researches directed on improving of implant materials properties [2].

One of the modification way is usage of composite materials with good utilitarian properties. The paper presents research results of structure and mechanical properties of composite materials based on the austenitic steel 316L with calcium pyrophosphate. The modifying addition was chosen on the base of earlier model researches [2,3].

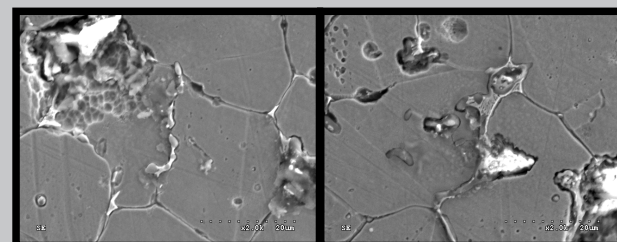
Materials and research methods

The sintered composite on the base of 316L stainless steel with addition of calcium pyrophosphate have been researched. Composite materials characterized by the $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ volume fraction of 5, 10 and 15% were fabricated. Materials were produced with the usage of powder metallurgy method. The technological process comprised cold pressing by the pressure of 500 MPa and sintering under the argon atmosphere at the temperature of 1150°C for 1 h. The specimens were cooled down naturally to the ambient temperature inside the furnace.

The influence of additions on condensation and the structure of acquired materials as well as their mechanical properties were researched. Microstructures etched with the universal reagent for austenitic steel have been observed in scanning electron microscope HITACHI S-3000N with an X-ray microanalyser VANTAGE. Microhardness was evaluated by the usage of Vickers Hanneman method on the microscope Neophot 21. The yield strenght was determined in static compressing test in an universal testing machine INSTRON 8502.

The results of research and discussion

Microstructures of obtained materials are presented on FIG.1 and 2. There are shown austenite grains and pores on the picture of nonmodified sintered steel 316L. However, in structure of composite materials are observed significant changes, obtained as a consequence of interaction of alloying components during sintering. Besides of metallic base matrix and calcium pyrophosphate in pores there are visible the precipitates of new phases on the grain boundaries as well as inside the grains. It might be noticed that precipitates amount risen with the $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ volume fraction. The chemical contents of identified phases for the composite with 15% addition are compared in TABLE 1. On FIG.3 are shown comparative spectrograms for nonmodified steel and

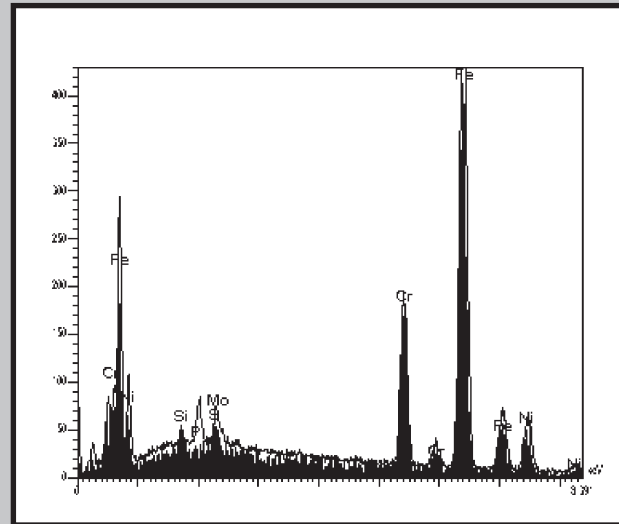


RYS. 2. Mikrostruktura kompozytu ze stali 316L z 10% dodatkiem $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, SEM, 2000x.

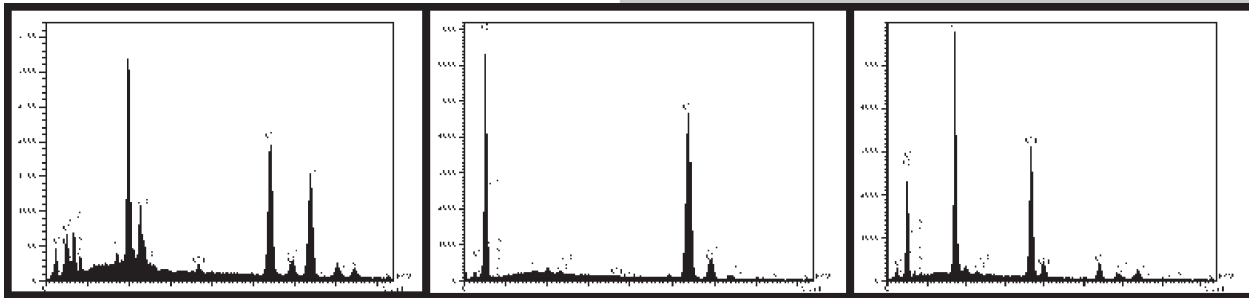
FIG. 2. The microstructure of 316L steel based composite with 10% addition of $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$, SEM, 2000x.

	316L	γ	β	δ	ε
Fe	68,51	68,89	34,94	1,84	4,30
Cr	17,22	13,85	30,12	47,36	4,64
Ni	11,39	12,88	4,93	0,24	0,91
Mo	2,03	0,00	10,90	0,56	1,00
Si	0,86	0,09	0,83	0,00	18,75
Mn	0,00	0,06	0,00	0,21	1,05
Ca	0,00	2,73	0,57	0,10	19,49
P	-	1,49	17,71	0,70	0,91
O	-	-	-	49,00	48,95

TABELA 1. Skład chemiczny faz występujących w strukturze kompozytu 316L+15%Ca₂P₂O₇.
TABLE 1. Chemical composition in wt. % of the phases presented in the structure of composite 316L+15% Ca₂P₂O₇.

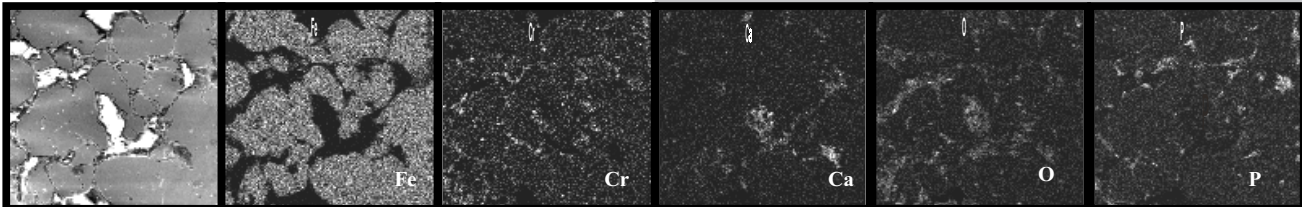


RYS. 3. Porównanie spektrogramów stali 316L oraz osnowy kompozytu 316L+15%Ca₂P₂O₇.
FIG. 3. The comparison of spectrograms of 316L



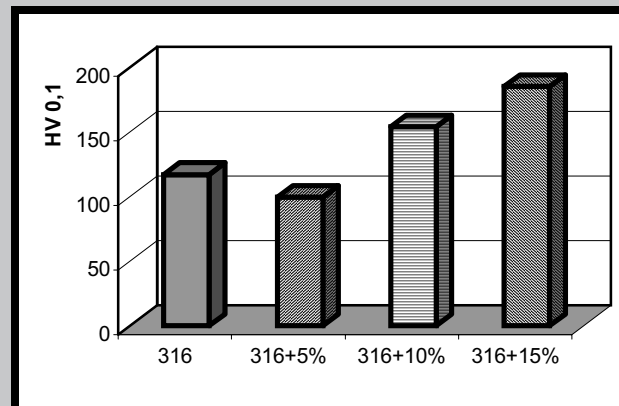
czas spiekania zachodziły intensywne procesy dyfuzji pierwiastków stopowych w stali oraz dodatków modyfikatora. Zawartość chromu w ziarnach stali obniżyła się na skutek tzw. utleniania wewnętrznego (TABELA 1). Natomiast na granicach ziarn można zauważyć lamelarne wydzielenia tlen-

RYS. 4. Wyniki mikroanalizy rentgenowskiej faz w kompozycie 316L z 15% dodatkiem Ca₂P₂O₇.
FIG. 4. Results of X-ray microanalysis of phases in composite 316L with 15% addition of Ca₂P₂O₇.

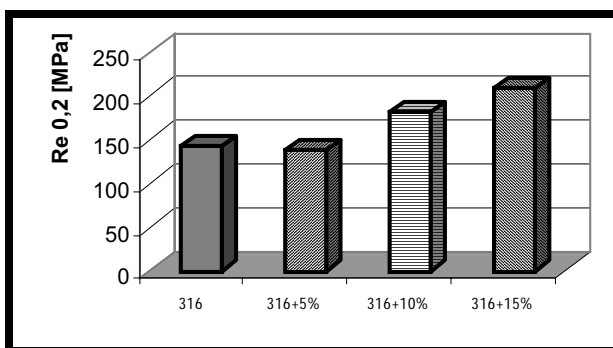


RYS. 5. Rozmieszczenie pierwiastków stopowych na powierzchni kompozytu 316L z 15% dodatkiem Ca₂P₂O₇.
FIG. 5. Distribution of elements on the surface of composite 316L with 15% addition of Ca₂P₂O₇.

ku chromu - faza oznaczona jako δ (RYS.2a i RYS.5Cr). Analogiczne zmiany można zaobserwować w przypadku krzemu - zmniejszenie zawartości Si w austenicie związane jest z pojawieniem wydzielen tlenkowych w obrębie ziarn austenitu (głównie tlenek krzemu i wapnia - faza ε : TABELA 1, RYS.4c). Nastąpiła także całkowita dyfuzja fosforu z obszaru porów. Część fosforu uległa rozpuszczeniu w austenicie. Analiza porównawcza spektrogramów bazowej stali 316L i austenitu w kompozycie wyraźnie wskazuje na obecność fosforu w roztworze stałym (RYS.3). Ponadto w kompozytach o dużym udziale modyfikatora pojawiły się eutektyki fosforowe na granicach ziarn (RYS.2b, RYS.5P). Świadczy to o udziale fazy ciekłej w procesie spiekania, co jest możliwe ze względu na dużą zawartość niklu w stali [5].



RYS. 6. Wpływ zawartości pirofosforanu wapnia na mikrotwardość kompozytów na bazie stali 316L.
FIG. 6. The influence of calcium pyrophosphate volume fraction on microhardness of 316L steel based composite.



RYS. 7. Wpływ zawartości pirofosforanu wapnia na wartość umownej granicy plastyczności $Re_{0.2}$ kompozytów na bazie stali 316L.

FIG. 7. The influence of calcium pyrophosphate volume fraction on yield strength $Re_{0.2}$ of 316L steel based composite.

Jak można przypuszczać, tak istotne zmiany w strukturze spieków kompozytowych powinny mieć również duży wpływ na ich właściwości mechaniczne. Na RYS. 6 i 7 przedstawiono wartości odpowiednio mikrotwardości i umownej granicy plastyczności $Rc_{0.2}$ badanych materiałów. Można zauważyć znaczący wzrost właściwości wytrzymałościowych w przypadku kompozytów o 10 i 15% zawartości pirofosforanu wapnia. Przyczyną tak dużego umocnienia materiału jest prawdopodobnie zwiększona zawartość fosforu w austenicie oraz obecność eutektyki fosforowej. Takie właściwości powinny zapewnić otrzymanym kompozytom dobrą odporność na ścieranie.

Wnioski

W wyniku zastosowanych parametrów spiekania kompozytu na bazie stali 316L z dodatkiem pirofosforanu wapnia w strukturze wystąpiły istotne zmiany w porównaniu ze stopem bazowym. Na skutek intensywnej dyfuzji pierwiastków stopowych nastąpiła segregacja składników i pojawiły się nowe fazy. Zmiany strukturalne, szczególnie rozpuszczenie fosforu w austenicie oraz powstanie eutektyki fosforowej wpłynęły również na właściwości wytrzymałościowe materiałów. Szczególnie w przypadku kompozytów z 10 i 15% dodatkiem $Ca_2P_2O_7$ uzyskano znaczny wzrost wartości mikrotwardości i granicy plastyczności w porównaniu z niemodyfikowaną stalią 316L.

Podziękowania

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji w ramach projektu KBN nr PBZ-082/T08/2002.

Piśmiennictwo

- [1] Disegi J.A., Eschbach L.: Stainless steel in bone surgery. *Injury, Int. J. Care Injured* 31 (2000), S-D2-6.
- [2] Sumita M., Hanawa T., Teoh S.H.: Development on nitrogen-containing nickel-free austenitic stainless steels for metallic biomaterials - review. *Materials Science and Engineering C* 24 (2004), 753-760.

the metallic matrix of composite with 15% addition $Ca_2P_2O_7$, while on FIG.4 there are presented results of X-ray microanalysis of new phases. The analysis of presented spectrograms and the distribution of main elements on the surface of composite specimens indicated that the diffusion of alloying elements has occurred during sintering process.

The chromium volume in steel grains decreased in consequence of internal oxidation (TABLE 1). However, it has been observed lamellar precipitates of chromium oxide - phase marked as δ (FIG.2a, FIG.5Cr) on the boundaries of steel grains. Analogous changes could be observed in the case of silicon - reduction of Si contain in austenite was brought about appearance of oxide precipitates inside the austenite grains (mainly silicon and calcium oxide - the ϵ -phase: TABLE 1, FIG.4c). There has occurred the complete diffusion of phosphorus from pores. The main volume of phosphorus has dissolved in austenite (TABLE 1). The comparative spectrogram analysis of basic 316L steel and austenite in composite material visibly shown the attendance of phosphorus in solid solution γ (FIG.3). Moreover there appeared phosphide eutectics on the grain boundaries (FIG.2b, FIG.5P). It meant that the sintering process proceeded with a share of liquid phase. It is possible considering the big content of nickel [4]

Such significant changes in the structure of composite materials should have a big influence on mechanical properties. On the figure 6 and 7 there are presented values of microhardness and yield strength $Rc_{0.2}$ of obtained materials. It might be noticed increase of mechanical properties of composite with 10 and 15% addition of calcium pyrophosphate. The reason of such great strengthening of material were probably the enlarged content of phosphorus in austenite and the attendance of phosphide eutectic. Those composites should be characterized with a good wear resistance.

Conclusion

In the structure of composite based on 316L stainless steel with addition of calcium pyrophosphate there were observed significant changes in comparison to the basic alloy as the result of chosen sintering parameters. The intensive diffusion of main alloying elements brought the segregation of components and appearance of new phases. The structural changes, particularly the solution of phosphorus in austenite and attendance of phosphide eutectics had an effect on mechanical properties of materials. The microhardness and yield strength values increased considerably in the case of composite with 10 and 15% of $Ca_2P_2O_7$ in comparison to nonmodified steel.

Acknowledgements

The work was supported by the Minister of Science and Information Society Technologies No PBZ-082/T08/2002.

References

- [3] Grądzka-Dahlke M., Dąbrowski J.R.: Ocena wpływu dodatków modyfikujących na właściwości tribologiczne kompozytu na bazie żelaza, *Inżynieria Biomateriałów*, nr 30-33 (2003), s. 41-43.
- [4] Grądzka-Dahlke M., Dąbrowski J.R.: Ocena właściwości kompozytów na bazie stopu implantacyjnego Co-Cr-Mo. *Inżynieria Biomateriałów*, nr 38-42 (2004), s. 50-53.
- [5] Smithells C. J.: *Metals Reference Book - 5th Edition*, Butterworths & Co. London, 1976.

CHARAKTERYSTYKA SPIEKÓW POROWATYCH ZE STALI 316L NA PANEWKI ENDOPROTEZ STAWOW

MAŁGORZATA GRĄDZKA-DAHLKE, JAN R. DĄBROWSKI

WYDZIAŁ MECHANICZNY,
POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA W BIAŁYMSTOKU

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),43-45]

Wprowadzenie

Endoprotezy stawów biodrowych typu metal/metal są stosowane od dziesiętków lat. Jednak przypadki niepowodzeń oraz niebezpieczeństwo zużycia podczas współpracy elementów metalowych powodują konieczność dalszych poszukiwań w zakresie rozwoju nowych materiałów i analizy mechanizmów tarcia w sztucznych stawach [1,2]. Pojawiają się badania nad możliwością odtworzenia warunków pracy w naturalnych stawach z ich niskim współczynnikiem tarcia, funkcjonalnością i niezawodnością. Równolegle z rozwojem wiedzy biomedycznej na temat mikrostruktury chrząstki stawowej i właściwości cieczy synowialnej, ewoluował teoretyczny opis mechanizmów tarcia w naturalnych stawach: od zastosowania hydrodynamicznej teorii smarowania Reynoldsa, przez model elastohydrodynamicznego smarowania Jonesa i Higginsa do opisów, uwzględniających oddziaływanie chrząstki stawowej i cieczy synowialnej pod wpływem obciążenia (np. "weeping lubrication" lub "boosted lubrication") [3]. Były próby zastosowania tej wiedzy do uzyskania materiałów na panewki stawów, m.in. wytworzenia warstwy porowatej na powierzchni panewki polietylenowej i nasycenia jej sztuczną cieczą synowialną (SBF) [4]. W rezultacie uzyskano znaczne obniżenie oporów ruchu, jednak modyfikacja polietylenu powoduje zmianę geometrii sztucznego łożyska. Niezbyt wysokie właściwości mechaniczne PE, dodatkowo zmniejszone przez modyfikację, nie zapewniają trwałości takiego połączenia. Pojawiła się koncepcja opracowania łożyska samosmarnego na bazie stopów implantacyjnych nasączonego SBF [5]. Celem niniejszej pracy było otrzymanie materiałów porowatych na bazie stali 316L i ocena ich właściwości tarcowych.

Materiały i metodyka badań

Badano spieki porowate, otrzymane z proszków stali 316L (SANDVIK METNINOX STEEL LTD). Celem uzyskania dużej porowatości otwartej do przygotowania spieków użyto proszku o wielkości ziarn 125÷250 µm. Próbkę do badań wykonano metodą metalurgii proszków. Proszek bazowy stali 316L poddano wyżarzaniu w temperaturze 950°C w czasie 2 godzin w próżni. Proces prasowania proszków przeprowadzono na jednoosiowej prasie hydraulicznej przy naciskach jednostkowych 200, 400 i 600 MPa. Wypraski spiekano w temperaturze 1150°C w czasie 1 godz. w próżni. Badano wpływ ciśnienia prasowania na strukturę, właściwości mechaniczne i tribologiczne otrzymanych materiałów porowatych. Porowatość całkowitą spieków określano metodą wagową, natomiast wielkość porowatości otwartej - przy pomocy piknometru gazowego Accu Pyc 1330. Ocena właściwości wytrzymałościowych przeprowadzono podczas

THE CHARACTERISTICS OF POROUS SINTERED COMPACTS OF 316L STEEL FOR BEARINGS OF HIP JOINT ENDOPROSTHESES

MAŁGORZATA GRĄDZKA-DAHLKE, JAN R. DĄBROWSKI

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING,
BIAŁYSTOK TECHNICAL UNIVERSITY

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),43-45]

Introduction

Metal-on-metal bearing systems for hip joint replacement have been used for decades. However, the failure cases and danger of wear during friction of elements made of the same metal have brought about the necessity of further researches in area of new materials as well as the analysis of friction mechanisms in artificial joints [1,2]. This has led to investigations as to reconstruct the working conditions in natural joints with their low friction coefficient, functionality and reliability. Apart from the development of biomedical knowledge of joint cartilage microstructure and synovial liquid properties there has evolved the theoretical description of friction mechanisms in natural joints: from Jones' and Higgins' model of elastohydrodynamic lubrication to specifications which have given consideration to the reactions between joint cartilage and synovial fluid (e.g. "weeping lubrication" lub "boosted lubrication") [3]. There were appeared ideas to apply this knowledge for materials and construction of artificial joints, e.g. by the modification of PE-bearing surface due to obtain a porous layer for saturating with simulated body fluid (SBF) [4]. As result there was got considerable lowering of resistance to motion. However, modification of PE causes change of geometry of artificial bearing. Poor mechanical properties of PE, additionally lowered by the modification, do not ensure durability of such joint.

In Białystok Technical University is developed a conception of self-lubricating friction pair for hip joint endoprostheses, made of implant alloys and saturated with SBF [5]. The subject of this work was to produce porous materials on the base of 316L steel and to investigate their tribological properties.

Materials and methods

The sintered compacts made of the 316 stainless steel powder (SANDVIK METNINOX STEEL LTD) have been investigated. Due to obtain the great value of open porosity there have been used powders with the particle size distribution of 125-250 µm. Materials were produced with the usage of powder metallurgy method. The powder was annealed in vacuum at the temperature of 950°C for 2 h before the process. After compaction at the pressure of 200, 400 and 600 MPa the specimens were sintered in vacuum at the temperature of 1150°C for 1 h.

The influence of pressing pressure on the structure of acquired materials as well as their mechanical and tribological properties were researched. The whole porosity was described through the usage of weight method while the value of open porosity - by the gas pycnometer Accu Pyc 1330. The yield strenght was determined in static compressing

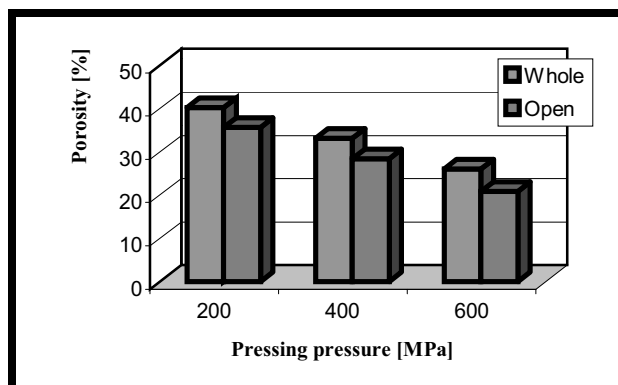
43
.....

próby ściskania statycznego na maszynie wytrzymałościowej INSTRON 8502.

Badania tribologiczne wykonano na symulatorze tarcia stawu biodrowego w Katedrze Materiałoznawstwa Politechniki Białostockiej. Umożliwia on odwzorowanie dynamiki obciążeń, jakim poddawane są materiały w elementach trących sztucznych stawów (ruch cyklicznie zmienny z małymi prędkościami oraz zmienne naciski). Badano skojarzenie: pierścień-tarcza przy ruchu obrotowo-rewersyjnym. Częstotliwość ruchu wynosiła 1 Hz, maksymalna prędkość poślizgu - $v_{p\max} = 0,018$ m/s. Obciążenie zadawane było w sposób sinusoidalny. Maksymalna wartość nacisków jednostkowych $p = 8$ MPa. Przeciwpółka w kształcie pierścienia wykonana była z litej stali 316L. Badania przeprowadzono w środowisku 2% roztworu karboksymetylocelulozy (KCM) w temperaturze pokojowej. Próbkę porowatą przed badaniami tarcowymi były nasączone cieczą roboczą w suszarce próżniowej. Czas trwania pojedynczego pomiaru wynosił 240min.

Wyniki badań i dyskusja

Wyniki badań wskazują na zdecydowany wpływ ciśnienia prasowania na porowatość i właściwości wytrzymałościowe otrzymanych spieków (RYS.1 i 2). Przy porowatości całkowitej w przedziale 26-41% udział porów zamkniętych, nieistotnych z punktu widzenia warunków smarowania, wynosi ok. 3-7%.



RYS. 1. Wpływ ciśnienia prasowania na porowatość spieków.
FIG. 1. The influence of pressing pressure on porosity of sintered metal.

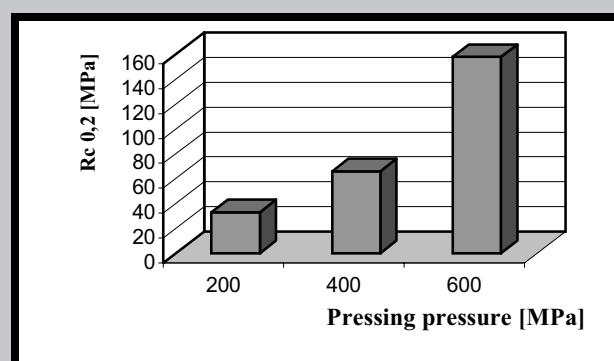
Na RYS.3 przedstawiono wyniki porównawczych badań tarcowych. Jak widać, tarcie w przypadku stali litej miało niestabilny charakter. Natomiast zastosowanie materiałów porowatych na jeden z elementów pary trącej spowodowało stabilizację procesu i obniżenie oporów ruchu, co świadczy o korzystnym wpływie porowatości na warunki smarowania w układzie tarcowym. W rezultacie uzyskano znaczne zmniejszenie wielkości zużycia materiałów, mierzonego na tribometrze przez zmianę szczeliny roboczej od 0,51 mm dla stali litej do 0,012 mm w przypadku materiałów porowatych (RYS.4).

Mikroskopowa analiza śladów tarcia badanych próbek potwierdza różny mechanizm tarcia i zużycia w przypadku litej stali 316L oraz materiałów porowatych. Na RYS.5 a,b,c pokazano powierzchnie spieków o porowatości odpowiednio: 41, 33 i 26% po 4-godzinny cykl badań tarcowych. Pomiędzy okształconymi i startymi ziarnami widoczne są pory, co świadczy, że ciecz smarowa mogła wydostawać się z porów materiału do szczeliny roboczej. Można zauważyć, że powierzchnia kontaktu w przypadku spieku o naj-

tests in an universal testing machine INSTRON 8502. The tribological tests were performed with a simulator of hip joint. The simulator imitates load dynamics in real joint. A reciprocating ring-on-disc system was used with a frequency of 1Hz. The rings were loaded along their axis (maximum contact pressure $p_{\max} = 8$ MPa). Friction force was measured. To describe extreme resistances to motion friction coefficients were calculated from maximum value of friction force. Tribological tests were carried on in lubricant conditions (2% water solution of carboxymethylcellulose). The porous specimens have been saturated with the lubricant in the vacuum drying chamber.

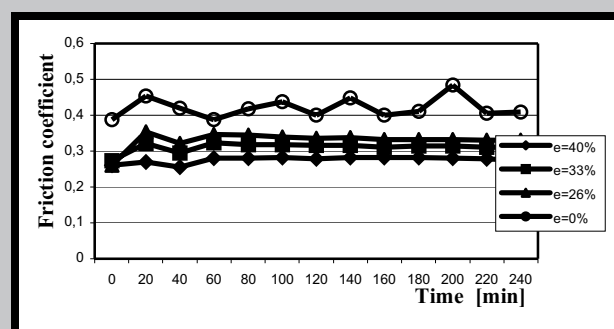
Results and discussion

The research results have shown the emphatic influence of pressing pressure on porosity as well as mechanical properties of sintered compacts (FIG.1,2). The value of closed porosity was insignificant (about 3-7%).



RYS. 2. Wpływ ciśnienia prasowania na wartość granicy plastyczności materiałów porowatych.
FIG. 2. The influence of pressing pressure on yield strength $Re_{0.2}$ results of porous materials.

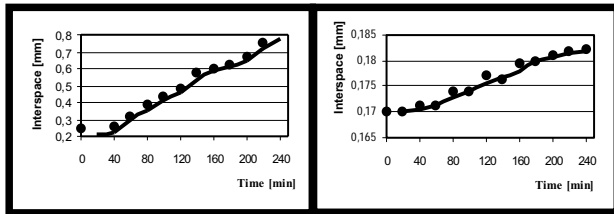
The results of comparative tribological tests have been pre-



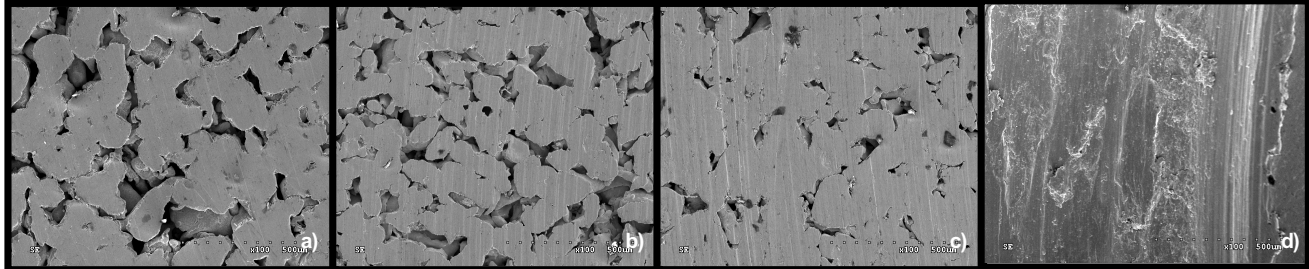
RYS. 3. Wpływ porowatości spieku na wartości współczynników tarcia.
FIG. 3. The influence of porosity of sintered material on friction coefficient.

sented on the FIG.3. In the case of nonporous steel the friction process was unsteady. However, the usage of porous material for one of elements of friction pair have stabilized the process and have decreased friction coefficient. It might be explained by the favourable influence of porosity on lubricant conditions in tribological system.

Microscopic analysis of friction tracks has confirmed different mechanism of friction and wear in case of porous and nonporous materials. On the FIG.5 a,b,c it has been shown



RYŚ. 4. Zmiany szczeliny roboczej w układzie tarcia wskutek zużycia: a) próbka - lita stal 316L, b) próbka - spiek porowaty ($e=33\%$).
FIG. 4. The changes of working interspace in tribological system through wear: a) sample - nonporous steel 316L, b) sample - porous steel 316 ($e=33\%$).



większej porowatości (RYŚ.5a) jest dość gładka. Potwierdza to dobre warunki smarowania podczas tarcia tej próbki. Natomiast na próbkach o mniejszej porowatości widoczne są ukierunkowane rysy, świadczące o udziale ściernego mechanizmu zużycia - wzrastającym wraz ze wzrostem gęstości materiału (RYŚ.5b,c). Mogą być spowodowane ściernym oddziaływaniem produktów zużycia, znajdujących się w strefie kontaktu. W przypadku próbki nieporowatej mechanizm zużycia był zupełnie inny. Na rysunku 5d widać, że dominowało zużycie adhezyjne, charakterystyczne w przypadku współpracy elementów wykonanych z tego samego materiału, szczególnie w warunkach dużych nacisków jednostkowych i małych prędkości ślizgania.

Wnioski

Metalurgia proszków oferuje interesujące rozwiązania technologiczne w zakresie otrzymywania nowych materiałów implantacyjnych. Wyniki badań pokazują, że zastosowanie materiału porowatego zmienia całkowicie mechanizm tarcia i zużycia w modelowym połączeniu, powodując zmniejszenie oporów ruchu i zużycie materiałów. Porównanie wyników badań wytrzymałościowych i tribologicznych wskazuje na celowość stosowania materiałów z gradientem porowatości dla zapewnienia wymogów biofunkcjonalności.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu KBN nr 3 T08D 050 26. Autorzy pragną wyrazić wdzięczność studentowi Wydziału Mechanicznego Politechniki Białostockiej, panu Wojciechowi Sawickiemu za udział w realizacji badań.

Piśmiennictwo

- [1] Hall R.M., Unsworth A.: Friction in hip prostheses. Review. *Bio-materials* 18 (1997).
- [2] Wimmer M.A., Loos J., Nassutt R., Heitkemper M., Fischer A.: The acting wear mechanisms on metal-on-metal hip joint bearings: in vitro results. *Wear* 250 (2001), 129-139.
- [3] Ryniewicz A. M.: Analiza mechanizmu smarowania stawu biodrowego człowieka Wydawnictwa Kraków, AGH 2002.

topography of surfaces of investigated materials with porosity as follows 41, 33 and 26 after 4-hours long tribological tests. Between deformed and worn steel grains there were visible pores what has shown that lubricating liquid had been able to move from pores to the working interspace (FIG.5a). It could be noticed that contact surface, in case of the biggest porosity, is quite smooth. It has confirmed good lubricating conditions during friction of this specimen. However, on sintered compacts with smaller porosity there have been visible directed scratches showing abrasive mechanism of wear (FIG.5b,c). In case of nonporous specimen wear mechanism was quite different. On FIG.5d it has been shown adhesive wear, specific in contact of elements made of the same material, especially in conditions of high pressure values and low sliding speed.

RYŚ. 5. Mikroskopowy obraz śladów tarcia badanych próbek (SEM, 200x): a) spiek o porowatości 41%, b) spiek o porowatości 33%, c) spiek o porowatości 26%, d) lita stal 316L.

FIG. 5. SEM image of surface of porous specimens after tribological tests (200x): a) 41% porosity, b) 33% porosity, c) 26% porosity, d) nonporous sample.

Conclusion

Powder metallurgy offers interesting technological solutions in the range of new implant materials acquiring. On the ground of obtained results it can be declared that the using of porous material has quite changed the friction and wear mechanism in the model system and caused decrease of resistance to motion and wear loss. Comparison of mechanical and tribological investigations has indicated the sense of purpose to use materials with the porosity gradient due to compliance with biofunctionality demands.

Acknowledgements

The work was supported by the Minister of Science and Information Society Technologies No PBZ-082/T08/2002. Authors wish to express appreciation to Wojciech Sawicki, a student of the Białystok Technical University for his participation in researches.

References

- [4] Grądzka-Dahlke M., Dąbrowski J.R.: The forming of tribological properties of materials for endoprostheses. 20th Danubia-Adria Symposium on Experimental methods in solid mechanics: Scientific Society of Mechanical Engineering, Budapest, 2003, 116-117.0.

WPŁYW WYBRANYCH MODYFIKACJI NA WŁAŚCIWOŚCI POWIERZCHNI TYTANU

MAŁGORZATA LEWANDOWSKA*, HALINA GARBACZ*,
BEATA POLAK**, WOJCIECH FABIANOWSKI**, JANUSZ KAMIŃSKI*,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ***

*POLITECHNIKA WARSZAWSKA WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
UL. WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA WYDZIAŁ CHEMICZNY,
UL. NOAKOWSKIEGO 3, 00-664 WARSZAWA

***AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE,
ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,
UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004. WARSZAWA

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie szeregu modyfikacji powierzchni zwiększających adhezję komórek do materiału oraz określenie ich wpływu na właściwości powierzchni litego tytanu. Zakres pracy obejmował: obserwację zmian topografii powierzchni przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego; pomiary chropowatości powierzchni; pomiary kąta zwilżania oraz badania odporności korozyjnej. Stwierdzono, że przeprowadzone modyfikacje nieznacznie zmieniają topografię powierzchni, powodując wzrost jej rozwinięcia. Modyfikowane powierzchnie zachowują hydrofilowy charakter i odznaczają się zwiększoną odpornością korozyjną.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),46-49]

Wprowadzenie

Właściwości, które wyróżniają tytan spośród innych materiałów to duża odporność na korozję w różnych środowiskach oraz mała gęstość 4,5g/cm³. Ponadto tytan jest materiałem niemagnetycznym, o wysokiej temperaturze topnienia, małym współczynniku rozszerzalności cieplnej i przede wszystkim wysokiej obojętności biologicznej. Właściwości te spowodowały, że tytan stał się ważnym materiałem dla medycyny. Jest to doskonały biomateriał, z którego wykonuje się różnego rodzaju implanty, narzędzia chirurgiczne, a także w postaci siateczek jest wykorzystywany jako rusztowanie dla żywych komórek i stosowany w inżynierii tkankowej. Z punktu widzenia inżynierii tkankowej podstawowe znaczenie ma stan powierzchni, jej skład chemiczny i topografia.

Podstawowym parametrem opisującym powierzchnię jest jej chropowatość. Zaobserwowano [1], że wzrost chropowatości jest korzystny dla rozwoju komórek kostnych, co zapewnia lepszą integrację wszczepu z kością. Komórki reagują na zmiany chropowatości wynoszące nawet 0,60µm, a powierzchnie wykazujące się większą chropowatością mają charakter bardziej hydrofilowy [2]. Jedną z cech tytanu jest zdolność do samopasywacji. Tworząca się na powierzchni warstwa tlenków zapewnia jej charakter hydrofilowy, co sprzyja wzrostowi komórek, ponieważ wykazuje ona powinowactwo do wody, tworząc wiązania wodorowe [3]. Udowodniono także, że naniesienie cienkiej warstwy hydroksyapatytu korzystnie wpływa na rozwój komórek kostnych [4], a trawienie w roztworze "pirania" powodujące uzyskanie porowatej powierzchni (w skali nano), polepsza adhezję i migrację osteoblastów [5].

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie szeregu mo-

INFLUENCE OF MODIFICATIONS ON THE PROPERTIES OF TITANIUM SURFACE

MAŁGORZATA LEWANDOWSKA*, HALINA GARBACZ*,
BEATA POLAK**, WOJCIECH FABIANOWSKI**, JANUSZ KAMIŃSKI*,
MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ***

*WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY FACULTY OF MATERIALS
SCIENCE AND ENGINEERING, WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAW

**WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY FACULTY OF CHEMISTRY,
NOAKOWSKIEGO 3, 00-664 WARSZAW

***MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, INSTITUTE OF BIOPHYSICS
AND HUMAN PHYSIOLOGY,
UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004. WARSZAW

Abstract

The aim of this work was to carry out various surface modifications which improve cell adhesion and to determine their influence on the properties of titanium surface. The research included: SEM observations of surface topography, roughness and contact angle measurements and corrosion resistance study. It was found that the applied modifications only slightly change the surface topography and lead to a slight increase of surface roughness. All modified surfaces are hydrophilic and reveal improved corrosion resistance.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),46-49]

Introduction

Such properties as: high corrosion resistance in various environments and low density (4,5 g/cm³) distinguish titanium among other metallic materials. In addition, titanium is nonmagnetic; it exhibits high melting temperature, low coefficient of thermal expansion and, in particular, high biological inertness. Due to these properties titanium is used in biomedical applications as material for implants and surgical tools. In recent years, titanium in the form of meshes was used in tissue engineering as a scaffold for living cells. From this point of view, the properties of surface, its chemical composition and topography play a crucial role.

One of the main parameters describing the surface is its roughness. It was observed [1] that an increase of surface roughness is beneficial for the growth of bone cells, which ensures better integration of the implant with the bone. The living cells are able to detect the change in surface roughness of the order of 0,6 µm and it was found that rougher surfaces reveal more hydrophilic character [2]. On the other hand, one of the characteristic features of titanium is its ability to self-passivation. As a result an oxide layer is formed on the titanium surface. This oxide layer ensures the hydrophilic character of the surface and thus favours the growth of cells [3]. The beneficial role of hydroxyapatite coating [5] and etching in the piranha solution [6] in improving cell adhesion and growth was also reported.

The aim of this work was to carry out various surface modifications which improve cell adhesion and to determine their influence on the properties of titanium surface. These modifications were previously applied to titanium meshes [6] and the preliminary results have shown their beneficial influence on the cell growth in culture. However, the determination of such important parameters as contact angle, roughness and

dyfikacji powierzchni zwiększających adhezję komórek do materiału oraz określenie ich wpływu na właściwości powierzchni litego tytanu. Modyfikacje te zostały wcześniej zastosowane do siateczek tytanowych [6], a wstępna analiza wykazała ich korzystny wpływ na wzrost komórek w hodowli in vitro. Geometria siateczek uniemożliwia jednak określenie szeregu ważnych właściwości, takich jak np. kąt zwilżania, chropowatość, czy odporność korozyjna.

Material i metodyka badań

Materiałem użytym do badań był tytan o czystości technicznej w postaci pręta o średnicy 20 mm, z którego wycięto próbki w postaci walców o grubości 2 mm. Próbki szlifowano na papierach ściernych o gradacji 600 i 800, wypłukano w płuczce ultradźwiękowej i odtłuszczono acetonem. Tak przygotowane próbki poddano trzem modyfikacjom: (1) trawienie w roztworze stężonego H_2SO_4 i 30% H_2O_2 w stosunku objętościowym 1:1 (tzw. roztwór "pirania") przez 4 godziny w temperaturze pokojowej; (2) naniesienie warstwy dekstranu z poli(kwasem akrylowym) (PAA) i dodatkiem jonów wapnia; (3) naniesienie warstwy aldehydu glutarowego oraz warstwy dekstranu z poli(kwasem akrylowym) (PAA) i dodatkiem jonów wapnia. Wymienione modyfikacje zostały opisane szczegółowo w pracy [6].

Zakres pracy obejmował: obserwację zmian topografii powierzchni przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego; pomiary chropowatości powierzchni; pomiary kąta zwilżania oraz badania odporności korozyjnej. Badania odporności korozyjnej powierzchni tytanu polegały na wykonaniu badań impedancyjnych oraz potencjodynamicznych.

Wyniki badań i dyskusja wyników

Obserwacje za pomocą SEM pokazały, że powierzchnia w stanie wyjściowym (przed modyfikacją) charakteryzuje się obecnością ukierunkowanych rys, będących wynikiem wcześniejszego szlifowania. Trawienie w roztworze "pirania" spowodowało pojawienie się na powierzchni charakterystycznych mikroporowatości. Natomiast modyfikacje polegające na zanurzeniu w roztworze dekstranu oraz aldehydu glutarowego i dekstranu nie wpływają znacząco na stan powierzchni. Na RYS.1 przedstawiono przykładowe obrazy powierzchni próbek tytanowych.

Pomiar chropowatości przeprowadzono w celu określenia stopnia rozwinięcia powierzchni próbek, w stanie wyjściowym oraz po przeprowadzonych modyfikacjach. Z otrzymanych profili chropowatości wyznaczono i analizowano dwa parametry określające chropowatość R_a i S_m , a ich wartości przedstawiono w TABELI 1. Otrzymane wyniki potwierdzają wpływ przeprowadzonych modyfikacji na stopień rozwinięcia powierzchni. Zarówno trawienie w roztworze "pirania" jak i naniesienie warstw polimerowych spowodowały niewielki wzrost obydwu analizowanych parametrów. Największe zmiany parametru R_a odnotowano dla modyfikacji w roztworze dekstranu, natomiast parametru S_m dla modyfikacji w roztworze aldehydu glutarowego i dekstranu. Kąt zwilżania zmierzono przy użyciu roztworu "DMEM" o złożonym składzie chemicznym, zbliżonym do płynów ustrojowych ludzkiego organizmu. Otrzymane wyniki zestawiono w TABELI 2. Wszystkie przeprowadzone modyfikacje spowodowały wzrost wartości kąta zwilżania. Na uwagę zasługuje fakt, że największy kąt zwilżania zaobserwowano dla próbki trawionej w roztworze piranii, o stosunkowo niewielkim stopniu rozwinięcia powierzchni. Próbkę tę charakteryzuje się jednak nano i mikro porowatością, niewykrywalną lub na granicy czułości zastosowanego profilometru,

corrosion resistance was impossible due to the mesh geometry.

47

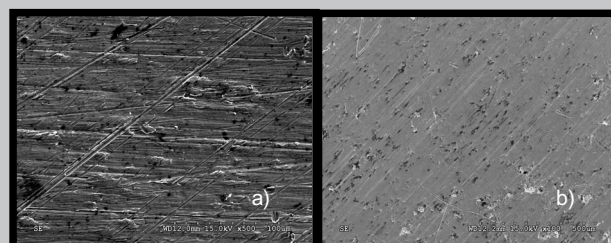
Material and experimental procedure

The material used in this study was technically pure titanium in the form of 20 mm rod from which samples in the form of 2 mm cylinders were cut out. The samples were polished, ultrasonically rinsed and then degreased in acetone. Next, the samples were subjected to three surface modifications: (1) etching in piranha solution, (2) dextran coating and (3) glutar aldehyd and dextran coating. All these modifications were described elsewhere [6].

The research included: SEM observations of surface topography, roughness and contact angle measurements and corrosion resistance study. Corrosion resistance study of titanium surface consisted in conducting impedance and potentiodynamic tests.

Results and discussion

SEM observations have shown that the characteristic feature of titanium surface in the initial state is the presence of oriented scratches resulting from polishing. On the surface etched in piranha solution, micro-porosity effects can be seen. Both polymer coatings (dextran and glutar aldehyd + dextran) do not change significantly the surface topography. FIG.1 shows images of unmodified and modified titanium surfaces.



RYS. 1. Obraz powierzchni próbek tytanowych: w stanie wyjściowym (a) oraz po trawieniu w roztworze pirania (b).

FIG. 1. Images of titanium surface: unmodified (a) and after etching in piranha solution (b).

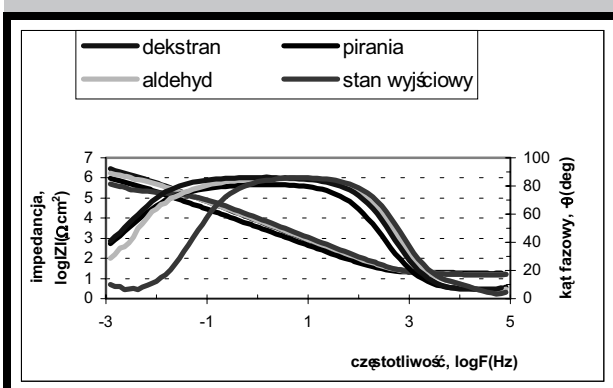
In order to quantify the surface development in the samples with unmodified and modified surfaces, the roughness measurements have been carried out. From the obtained roughness profiles two parameters, R_a and S_m , describing the surface roughness have been determined. Their values are shown in TABLE 1. The results confirm the influence of modifications on surface development. All modifications result in a slight increase of both roughness parameters. The highest changes in R_a parameter were observed for modification in dextran solution, whereas for S_m parameter - for modification in glutar aldehyd + dextran solution.

The contact angle was measured using "DMEM" solution which chemical composition is similar to human body fluids. The obtained values of contact angle are presented in TABLE 2. The results clearly indicate that all modifications lead to the increase of contact angle value (the most significant increase is observed in the sample etched in piranha solution). This sample is characterized by nano- and micro-porosity, undetectable for the used profilometer, which can significantly influence wettability of titanium surface. However, it should be noted that all surfaces have hydrophilic character.

The results of impedance studies are presented in the form of Bode's diagrams (FIG.2). They show the high values of

Rodzaj modyfikacji / Modification	R_a [μm]	S_m [μm]
Stan wyjściowy / Unmodified	0,110	133
Trawienie w roztworze pirania / Piranha solution	0,175	194
Warstwa dekstranu / Dextran coating	0,225	195
Aldehyd glutarowy i dekstranu / Glutar aldehyd and dextran coating	0,200	237

TABELA 1. Wartości parametrów określających chropowatość powierzchni tytanowych. (R_a - średnie arytmetyczne odchylenie profilu chropowatości, S_m - średni odstęp chropowatości).
TABLE 1. Roughness parameters for unmodified and modified titanium surfaces. (R_a - average roughness, S_m - mean spacing of profile irregularities).



RYS. 2. Widma impedancyjne badanych powierzchni tytanowych.
FIG. 2. Bode's diagrams of titanium surfaces exposed in SBF solutions.

co w istotny sposób może zmieniać zwilżalność powierzchni tytanu. Należy zaznaczyć, że pomiar kąta zwilżania wykazał hydrofilowy charakter wszystkich badanych powierzchni.

Wyniki badań impedancyjnych przedstawiono w formie wykresów Bode'go (RYS.2). Charakteryzują się one wysokimi wartościami kąta fazowego, bliskimi 90 stopni, w szerokim zakresie częstotliwości. W wyniku przeprowadzonych modyfikacji następuje wyraźny wzrost zakresu częstotliwości w obszarze wysokich wartości kątów fazowych, w porównaniu do stanu wyjściowego, co świadczy o większej trwałości wytworzonych warstw pasywnych. Zauważyć również można przesunięcie modułu impedancji w kierunku wyższych wartości. Jest to związane ze wzrostem wartości parametru R_t , będącego oporem przejścia elektronów z podłoża do elektrolitu przez warstwę podwójną. Badania potencjodynamiczne (RYS.3) pokazały, że w stosunku do stanu wyjściowego, następuje obniżenie wartości gęstości prądów korozyjnych przy jednoczesnym utrzymaniu stanu pasywnego w szerokim zakresie potencjałów.

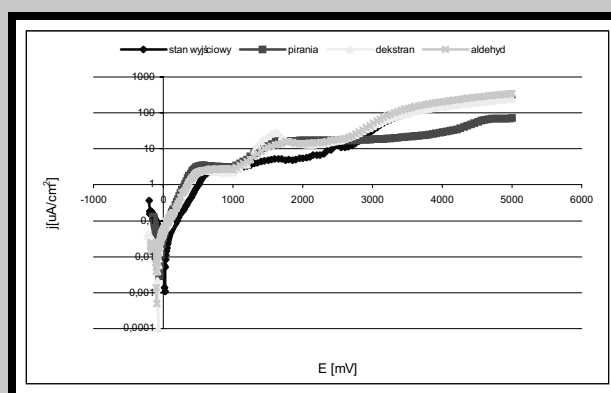
Wnioski

Z przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

- Zastosowane modyfikacje zwiększają chropowatość powierzchni oraz polepszają odporność korozyjną tytanu.

Rodzaj modyfikacji / Modification	R_a [μm]	S_m [μm]
Stan wyjściowy / Unmodified	0,110	133
Trawienie w roztworze pirania / Piranha solution	0,175	194
Warstwa dekstranu / Dextran coating	0,225	195
Aldehyd glutarowy i dekstranu / Glutar aldehyd and dextran coating	0,200	237

TABELA 2. Wartości kąta zwilżania dla powierzchni tytanowych w roztworze DMEM.
TABLE 2. Values of contact angle for unmodified and modified titanium surfaces. SD is standard deviation.



RYS. 3. Krzywe polaryzacji badanych powierzchni tytanowych.
FIG. 3. Polarisation curves of titanium prior to and after modifications.

phase angle (close to 90 degrees) at broad frequency range. Due to the modifications carried out, the frequency range in high value phase angles significantly increases in comparison to the unmodified surface. This proves higher resistance of composed passive layers. At the same time, the impedance module moves towards higher values due to the rise of R_t parameter value. This parameter expresses charge transfer resistance.

Polarizations curves (FIG.3) show that - in comparison to unmodified titanium surface - the value of corrosion currents density decreases while passive state does not change in broad potentials' range.

Conclusions

From the conducted research the following conclusions can be drawn:

- The modifications which have been applied for titanium surface lead to the increase of surface roughness and to the improvement of its corrosion resistance.
- Investigated surfaces exhibit a hydrophilic character.
- Dextran coating seems to be the most promising method of modifications since it improves most significantly corrosion resistance and surface roughness.
- Characteristic micro-porosity, undetectable for profilometer, occurring on surfaces etched in the piranha solution can be an additional factor favourable for cells growth. This problem will be a subject of further research.

- Badane powierzchnie wykazują charakter hydrofilowy.
- Obiecującą modyfikacją wydaje się być naniesiona warstwa dekstranu, która w największym stopniu zwiększa odporność korozyjną oraz chropowatość powierzchni.
- Wytworzenie na powierzchni trawionej w roztworze pirania charakterystycznych mikroporowatości, niewykrywalnych przy zastosowaniu profilometru, może być dodatkowym czynnikiem sprzyjającym wzrostowi komórek. Problem ten będzie przedmiotem dalszych badań.

Podziękowanie

Praca badawcza zrealizowana w ramach projektu badawczego zamawianego 5/PBZ-KBN-082/T08/2002.

Piśmiennictwo

- [1] M.Wieland, M.Textor, B.Chehrudai, D. M.Brunette, Synergistic interaction of topographic features in production bone-like nodules on Ti surfaces by rat osteoblasts, *Biomaterials* 26 (2005) 1119-1130.
- [2] D.D.Deligianni, N.Katsala, S. Leda, D.Sotiropoluou, J.Amedee, Y.F.Missirlis, Effect of surface roughness of titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption, *Biomaterials* 22(2001) 1241-1251.
- [3] S.Kanagaraja, A.Wennerberg, C.Eriksson, H.Nygren, Cellular reaction and bone apposition to titanium surface with different surface roughness and oxide thickness cleaned by oxidation, *Biomaterials* 22(2001) 1809-1818.

HYDROLITYCZNA I ENZYMATYCZNA DEGRADACJA KOPOLIMERU GLIKOLIDU Z L-LAKTYDEM

ELŻBIETA PAMUŁA, MAGDALENA M. RUTKOWSKA

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA
EPAMULA@AGH.EDU.PL

Streszczenie

Kopolimer glikolidu z L-laktydem (PGLA) poddano degradacji w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) i roztworze PBS zawierającym trypsynę. Zmiany zwilżalności w funkcji czasu degradacji badano metodą kropki, podczas gdy topografię i morfologię powierzchni oceniano za pomocą mikroskopu sił atomowych i mikroskopu do światła odbitego. Wykazano, że folie PGLA tracą spójność w czasie 6 tygodni w wyniku degradacji w masie. Trypsyna nie przyspiesza procesu degradacji PGLA.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),49-52]

Wprowadzenie

Kopolimery glikolidu z L-laktydem są z powodzeniem wykorzystywane jako biomateriały, nośniki leków i rusztowania dla komórek w inżynierii tkankowej [1]. Materiały te ulegają degradacji w wyniku reakcji hydrolizy wiązań poliestrowych, chociaż wykazano, że obecność niektórych en-

Acknowledgement

This work was supported by the State Committee for Scientific Research - grant No 5/PBZ-KBN-082/T08/2002.

References

- [4] J.W.M.Vehof, P.H.M. Spuwen, J.A.Jensen, Bone formation in calcium-phosphate-coated titanium mesh, *Biomaterials* 21 (2000) 2003-2009.
- [5] P. Tambasco de Oliveira, A.Nanci, "Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells", *Biomaterials* 25 (2004) 403-413.
- [6] M.Lewandowska, H.Garbac, B.Polak, W.Fabianowski, M.Lewandowska-Szumiał: "Modyfikacje powierzchni siateczek tytanowych przeznaczonych na implanty" *Inżynieria Biomateriałów*. 38-43 (2004) 60-62.

HYDROLYTIC AND ENZYMATIC DEGRADATION OF POLY-(GLYCOLIDE-CO-L-LACTIDE)

ELŻBIETA PAMUŁA, MAGDALENA M. RUTKOWSKA

AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND
EPAMULA@AGH.EDU.PL

Abstract

Copolymer of glycolide and L-lactide (PGLA) has been submitted to degradation in phosphate buffered saline (PBS) and in PBS containing trypsin. The evolution of wettability during degradation was studied by sessile drop while topography and morphology were evaluated by atomic force microscopy and optical microscopy. It was shown that PGLA foils lose their integrity within 6 weeks, due to 'in bulk' degradation. Trypsin seems not to accelerate degradation of PGLA.

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),49-52]

Introduction

Copolymers of glycolide and L-lactide have received considerable attention as degradable devices for medicine, drug delivery, and scaffolds for tissue engineering applications [1]. Such materials degrade through simple hydrolysis of polyester bonds, however it was shown that presence or enzymes isolated from fungi or bacteria can accelerate their degradation time, for example proteinase K preferentially degrades L-lactyl units of polylactides [2-3]. It was recently shown that trypsin can influence degradation of porous scaffolds.

zymów wyizolowanych z grzybów lub bakterii może przyspieszać ich czas degradacji, np. proteoliza K powoduje preferencyjne rozrywanie wiązań w poli-L-laktydach [2-3]. Ostatnio stwierdzono, że trypsyna może wpływać na degradację porowatych rusztowań dla inżynierii tkankowej wykonanych z kopolimeru glikolidu z L-laktydem, przyspieszając ich ubytek masy [4]. Trypsyna jest enzymem o szczególnym znaczeniu, ponieważ jest rutynowo wykorzystywana w hodowlach komórkowych *in vitro*. Trypsynę klasyfikuje się do grupy hydrolaz, dlatego potencjalnie może ona również powodować rozrywanie wiązań poliestrowych. Z tego względu, wydaje się niezwykle ważne określenie, czy enzym ten wpływa na kinetykę degradacji materiałów wykorzystywanych jako podłoża dla komórek.

Celem pracy było ocenienie wpływu trypsyny na degradację folii PGLA. Zastosowano stężenie trypsyny odpowiadające warunkom hodowli komórkowych.

Część eksperymentalna

Materialy

Kopolimer glikolidu z L-laktydem (PGLA) zsyntezowano według metody opisanej poprzednio [5]. PGLA miał następujące właściwości: stosunek molowy glikolidu do L-laktydu - 17:83, liczbowo-średnia masa cząsteczkowa, $M_n=50.5$ kDa, współczynnik polidispersji $d=2.3$ i temperatura transformacji, $T_g=54^\circ\text{C}$. Folie o grubości 0.18 ± 0.02 mm otrzymano metodą odlewania z roztworu polimeru w chlorku metylenu (POCH, Gliwice, Polska) na szklane szalki Petriego i suszenia na powietrzu i w próżni co najmniej przez 24h.

Próbki polimerowe (średnica 15 mm) umieszczono w 24-dółkowych płytkach hodowlanych (Nunc, Dania) i do każdego dołka dodano 2 ml buforowanego roztworu soli fizjologicznej PBS (137 mM NaCl, 6.44 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4) lub roztworu trypsyny w PBS (5 mg/ml, Sigma, Niemcy). Badaniom poddano powierzchnię dolną folii, tj. kontaktującą się ze szkłem w trakcie otrzymywania. Płytki umieszczono w temperaturze 37°C na czas od 1 do 6 tygodni. Następnie próbki przemyto dziesięciokrotnie poprzez odpompowanie 1,5 ml płynu i dodanie 1,5 ml wody UHQ (PureLab, Elga, Niemcy). Próbki suszono w eksykatorze nad P_2O_5 przez 2 tygodnie. W pozostałych próbkach co tydzień wymieniano roztwór poprzez odpompowanie 1,5 ml płynu i dodanie 1,5 ml świeżego płynu.

Metody

Badania topografii powierzchni przeprowadzono w powietrzu za pomocą mikroskopu sił atomowych Explorer (ThermoMicroscopes, Veeco, USA). Obrazy w trybie kontakt zarejestrowano za pomocą sond Si_3N_4 o stałej sprężystości 0,05 N/m i nominalnej krzywiznie ostrza 20 nm (Veeco NanoProbeTM Tips, model MLC-EXMT-A). Obrazy zarejestrowano dla różnych obszarów skanowania: $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$, $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$, $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$, $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ dla trzech losowo wybranych miejsc (rozdzielczość 300×300 punktów) z szybkością skanowania 5 linii/s. Wszystkie obrazy poddano procesowi spłaszczania z wykorzystaniem oprogramowania dostarczonego wraz z urządzeniem. Dla wszystkich obszarów skanowania wyznaczono chropowatość Ra.

Morfologię folii obserwowano za pomocą mikroskopu do światła odbitego (Nicon, Epiphot 300, powiększenie 20x). Kąt zwilżania wyznaczono metodą kropli za pomocą automatycznego systemu analizy kształtu kropli DSA 10 Mk2 (Kruss, Niemcy). Krople wody UHQ (oczyszczonej przez Purelab UHQ, Elga, Niemcy) o objętości $0.2\ \mu\text{l}$ kładziono na powierzchni próbki. Wynik przedstawiano jako średnią z 10-12 pomiarów pojedynczych kropli.

folds made of copolymers of glycolide and L-lactide, by enhancing their weight loss [4]. Trypsin is an enzyme of particular interest, because it is routinely used for cell culturing *in vitro*. Trypsin is classified to the group of hydrolases, therefore it potentially could catalyze degradation of polyester bonds. Hence, it is important to know if this enzyme affects degradation kinetics of materials used as a support of cells.

The aim of this study was to evaluate the influence of trypsin on degradation of PGLA foils. The concentration of trypsin was that of used in cell culture conditions.

Experimental part

Materials

Copolymer of glycolide and L-lactide (PGLA) was synthesized according to the method described previously [5]. PGLA had the following parameters: molar ratio of glycolide and L-lactide - 17:83, number average molecular weight, $M_n=50.5$ kDa, polydispersion index $d=2.3$ and glass transition temperature, $T_g=54^\circ\text{C}$. Foils having thickness of 0.18 ± 0.02 mm were obtained by slip casting of polymer solution in methylene chloride (POCH, Gliwice) on glass Petri dishes, followed by air and vacuum drying for at least 24 h. The polymer samples (diameter of 15 mm) were placed into Nunclon Multidishes (24 wells, Nunc, Denmark) and 2 ml of phosphate buffered saline PBS (137 mM NaCl, 6.44 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4) or trypsin solution in PBS (5 mg/ml, Sigma, Germany) were poured to each well. Always the lower surface of the foil, e.g. contacting glass during slip-casting, was analysed. The multidishes were put in an incubator at 37°C for 1 - 6 weeks. Samples were then rinsed 10 times by pumping 1.5 ml of the liquid and adding 1.5 ml UHQ water (Pure Lab UHQ, Elga, Germany) followed by drying in a dessicator over P_2O_5 for two weeks. In the remaining samples the solution was exchanged every week by pumping 1.5 ml of the liquid and adding 1.5 ml of the fresh liquid.

Methods

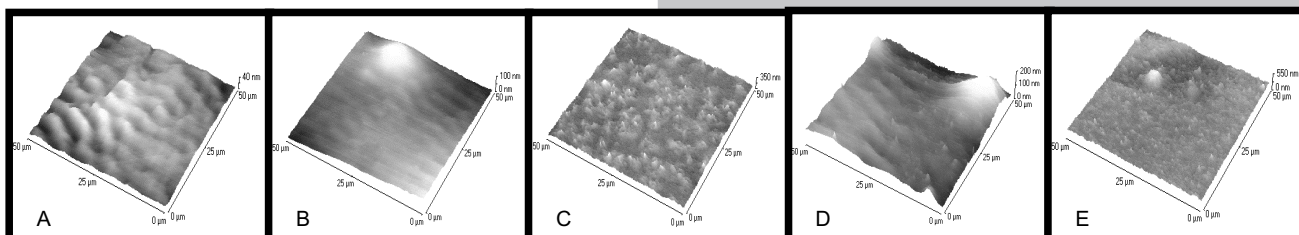
Topography measurements were performed under ambient laboratory conditions with an Explorer atomic force microscope (ThermoMicroscopes, Veeco, USA). Contact mode topographic images were recorded using Si_3N_4 tips with a spring constant of 0.05 N/m and a nominal radius of curvature of 20 nm (Veeco NanoProbeTM Tips, model MLC-EXMT-A). The images were recorded at different scan areas: $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$, $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$, $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$, $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ for three aleatory chosen places (300×300 data points) and with scan rate of 5 lines/s. All images were flattened using a third order polynomial algorithm provided with the instrument. Roughness (Ra) was calculated for all scanned areas.

Morphology of the foils was observed by an optical microscope (Nicon, Epiphot 300, magnification 20x).

The contact angle was measured by sessile drop method by an automatic drop shape analysis system DSA 10 Mk2 (Kruss, Germany). UHQ- water (produced by Purelab UHQ, Elga, Germany) droplets of the volume of $0.2\ \mu\text{l}$ were put on each sample and the contact angle was obtained by averaging the results of 10-12 measurements.

Results and discussion

Visual examination shows that PGLA foils were initially transparent. After 1 week of incubation in both media the foils become white and opaque. Interestingly the foils in contact with pure PBS remain glistening, while that degraded



RYS. 1. Obrazy topograficzne AFM powierzchni PGLA (obszar skanowania $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$): A-przed degradacją ($z=40\text{ nm}$), B-po 1 tygodniu w PBS ($z=100\text{ nm}$), C-po 1 tygodniu w roztworze trypsyny ($z=350\text{ nm}$), D-po 3 tygodniach w PBS ($z=200\text{ nm}$) i E-po 3 tygodniach w roztworze trypsyny ($z=550\text{ nm}$).

FIG. 1. AFM topographical images of PGLA surface (scan area $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$): A-before degradation ($z=40\text{ nm}$), B-after 1 week in PBS ($z=100\text{ nm}$), C-after 1 week in trypsin solution ($z=350\text{ nm}$), D-after 3 weeks in PBS ($z=200\text{ nm}$) and E-after 3 weeks in trypsin solution ($z=550\text{ nm}$).

Wyniki i dyskusja

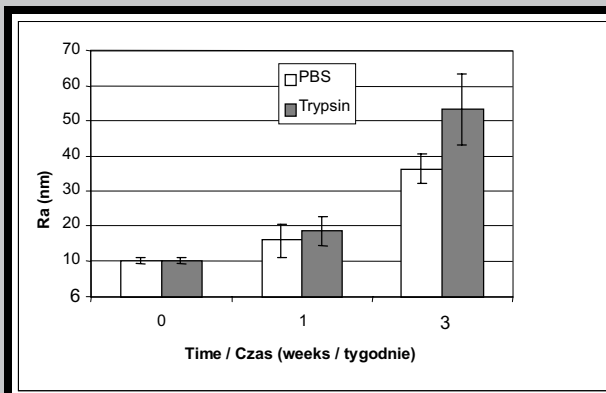
Folie PGLA były początkowo przezroczyste. Po pierwszym tygodniu inkubacji, niezależnie od rodzaju płynu stały się białe i nieprzezroczyste. Folie kontaktujące się z PBS pozostały lśniące do końca eksperymentu, podczas gdy inkubowane w roztworze trypsyny stały się matowe. Po 4 tygodniach degradacji folie zaczynały się kruszyć podczas wyjmowania z dołków.

RYS.1 przedstawia obrazy topograficzne AFM folii PGLA przed i po inkubacji w PBS i PBS zawierającym trypsynę. Powierzchnia folii PGLA przed degradacją była stosunkowo gładka i występowały na niej tylko struktury faliste o wysokości nie przekraczającej 40 nm (RYS.1A). Taka budowa powierzchni jest charakterystyczna dla folii polimerowych otrzymanych metodą odlewania z roztworu i powstaje w czasie odparowywania rozpuszczalnika. Inkubacja w PBS powodowała powstawanie wybrzuszeń na powierzchni, których wysokość osiągała 100 nm i 200 nm dla czasów degradacji odpowiednio 1 i 3 tygodnie (RYS.1B, D). Na powierzchni folii kontaktującej się z roztworem trypsyny obserwowano aglomeraty białka już po 1 tygodniu inkubacji (RYS.1C). Aglomeraty białka tworzyły monowarstwę po 3 tygodniach inkubacji (RYS.1D).

Inkubacja w obu mediach powodowała wzrost chropowatości powierzchni R_a (RYS.2), głównie z powodu wytworzenia się wybrzuszeń. Chropowatość folii PGLA inkubowanej w roztworze trypsyny była zawsze nieco wyższa z uwagi na zaadsorbowane cząsteczki białka.

Mikrostrukturę folii obserwowaną za pomocą mikroskopu do światła odbitego przedstawiono na RYS.3. Przed degradacją powierzchnia folii polimerowej była gładka (RYS.3A). Inkubacja w PBS przez 6 tygodni spowodowała powstanie wybrzuszeń o średnicy około $200\mu\text{m}$ (RYS.3C). Na powierzchni próbek degradowanych w roztworze trypsyny już po pierwszym tygodniu występowały białe wydzielania (RYS.3B). Wielkość wydzieleń wzrastała w funkcji czasu inkubacji. Po 6 tygodniu inkubacji białko tworzyło monowarstwę.

RYS.4 przedstawia zależność kąta zwilżania w funkcji czasu inkubacji w obu mediach. Kąt zwilżania folii degradowanej w czystym PBS nie zmieniał się w funkcji czasu, chociaż folie stawały się nieprzezroczyste i kruche. Kąt zwilżania folii inkubowanej w roztworze trypsyny obniżał się do 3

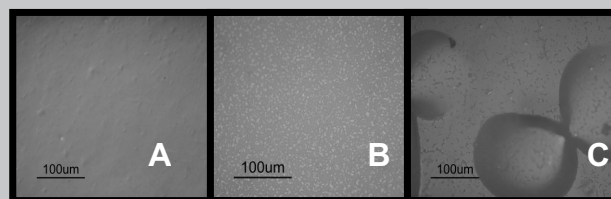


RYS. 2. Zależność chropowatości R_a od czasu degradacji w PBS i roztworze trypsyny (obszar skanowania $100\text{ mm} \times 100\text{ mm}$, $n=3 \pm$ odchylenie standardowe).

FIG. 2. Evolution of R_a roughness as a function of degradation time in PBS and trypsin solution (scan areas $100\text{ mm} \times 100\text{ mm}$, $n=3 \pm$ standard deviation).

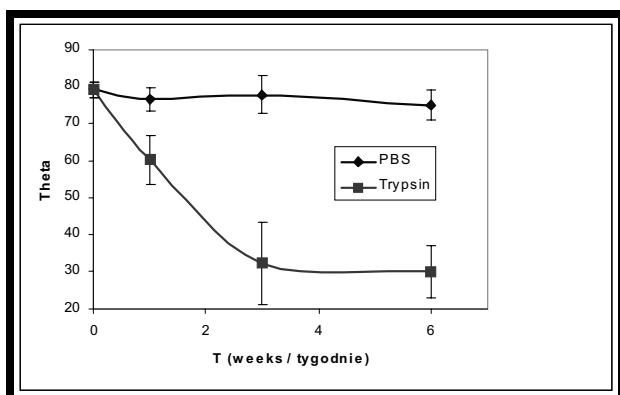
in trypsin solution become mat. After 4 weeks of degradation the foils start to crumble while taking them out of the wells.

FIG.1 presents AFM topographical images of the PGLA surface before and after incubation in PBS and PBS supplemented with trypsin. The surface of PGLA before degradation was quite smooth and only wave-like features of the high not exceeding 40 nm were present (FIG.1A). Such topographical features are characteristic for polymeric foils obtained by slip casting and are created during evaporation of the solvent. Incubation in PBS resulted in creation of bangles (FIG.1B, D); their high was 100 nm and 200 nm for degradation time 1 and 3 weeks, respectively. On the surface of foils being in contact with trypsin protein agglomerates were clearly visible after 1 week of incubation (FIG.1C). The protein agglomerates formed a monolayer after 3 weeks of incubation (FIG.1D).



RYS. 3. Morfologia powierzchni PGLA: (A) przed degradacją, (B) 1 tydzień po degradacji w roztworze trypsyny i (C) 6 tygodni w roztworze PBS (mikroskop od światła odbitego, powiększenie $20\times$).

FIG. 3. Morphology of the PGLA surface: (A) before degradation, (B) after 1 week of degradation in trypsin solution and (C) and after 6 weeks in PBS (optical microscope, magnification $20\times$).



RYS. 4. Zależność kąta zwilżania od czasu inkubacji w PBS i roztworze trypsyny.

FIG. 4. Evolution of water contact angle as a function of incubation time in PBS and in trypsin solution.

tygodnia i później nie ulegał zmianie. Wyniki wskazują, że wzrost hydrofilowości był wynikiem adsorpcji cząsteczek białka.

Podsumowując, folie PGLA ulegają bardzo szybkiej degradacji w środowisku wodnym. Po pierwszym tygodniu stają się nieprzezroczyste i po 6 tygodniach tracą spójność. Pojawienie się wybrzuszeń już po pierwszym tygodniu inkubacji i ich wzrost do szóstego tygodnia sugerują, że folie degradują się w masie. Stały kąt zwilżania poprzez cały czas inkubacji w PBS wykazuje, że erozja powierzchni nie jest głównym mechanizmem degradacji folii PGLA. Trypsyna nie wpływa na degradację folii PGLA, chociaż warstwa zaadsorbowanego białka może stanowić barierę dyfuzyjną dla produktów degradacji (rozpuszczalnych oligomerów) i zapobiegać ich wydzielaniu się do środowiska wodnego.

Podziękowania

Praca sfinansowana przez Ministra Nauki i Informatyki (projekt Nr 3 T08D 019 28)

Piśmiennictwo

- [1] S. Dumitriu; Polymeric biomaterials; Marcel Dekker Inc., USA 2002; str. 91-97, 179-181.
- [2] M. S. Reeve, S. P. McCarthy, M. J. Downey, R.A. Gross; Polylactide stereochemistry: effect on enzymatic degradability; *Macromolecules* 27 (1994) 825-831.
- [3] Z. Gan, D. Yu, Z. Zhong, Q. Liang, X. Jing; Enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone)/poly(DL-lactide) blends in phosphate buffer solution; *Polymer* 40 (1999) 2859-2862.

Incubation in both media causes an increase of Ra roughness (FIG.2), mainly due to creation of bangles. The roughness of PGLA foils incubated in contact with trypsin was always slightly higher due to adsorbed protein molecules. The microstructure of the foils observed under optical reflection microscope is presented in FIG.3. Before degradation the surface of polymeric foil was smooth (FIG.3A). Incubation in PBS for 6 weeks resulted in creation of many bulges about 200 μ m in diameter (FIG.3C). On the surface of samples degraded in trypsin solution already after 1-week incubation white spots appeared (FIG.3B). The size of spots increases as a function of incubation time. After 6 weeks of incubation a monolayer of the protein was observed.

FIG.4 presents the evolution of water contact angle as a function of incubation time in both media. Contact angle of the samples degraded in pure PBS did not change during degradation, although the foils changed colour and become fragile. Contact angle of the foils incubated with trypsin solution decreased till the third week and remained constant. The results imply that increase of hydrophilicity was due to adsorption of protein molecules.

In conclusion, PGLA foils degrade very fast in aqueous media. After 1 week they become opaque and after 6 week they lose integrity. Appearance of bangles already after 1-week degradation and their grow till the 6th week suggest that the foils degrade 'in bulk'. Contact angle stability for the whole period of incubation in PBS suggest that surface erosion is not the main degradation mechanism of PGLA. Trypsin seems not to influence degradation of PGLA, although protein layer can act as a diffusion barrier preventing degradation products (soluble oligomers) to be released to the aqueous medium.

Acknowledgements

This work was financed by the Minister of Science and Information Society Technologies, as a research project No 3 T08D 019 28

References

- [4] Q. Cai, G. Shi, J. Bei, S. Wang; Enzymatic degradation behaviour and mechanism of poly(lactide-co-glycolide) foams by trypsin; *Biomaterials* 24 (2003) 629-638.
- [5] P. Dobrzyński, J. Kasperczyk, H. Janeczek, M. Bero; Synthesis of biodegradable copolymers with use of low toxic zirconium compounds. 1. Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by Zr(acac)₄; *Macromolecules* 34 (2001) 5090-5098.

PREPARATYKA WARSTW KOMPOZYTOWYCH HYDROKSYAPATYT-ŻELATYNA METODĄ ZOL - ŻEL

STOCH A., DŁUGOŃ E., JASTRZĘBSKI W., ADAMCZYK A.

WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW,
ANNA.STOCH@POCZTA.ONET.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),53-54]

Kości i zęby są nanokompozytami fazy mineralnej i protein. Fazę mineralną stanowią przeważnie apatyty takie jak hydroksyapatyt $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ (HAP), fluoroapatyt i apatyt węglanowy [1]. Przyjmuje się, że osadzanie się hydroksyapatytu poprzedza wytworzenie się matrycy kolagenowej co oznacza, że matryca ta stanowi rusztowanie dla fazy mineralnej [2,3]. Pewne grupy badawcze próbowały wytworzyć syntetyczną kość poprzez reakcję współstrącania nanokryształów HAP w rozpuszczonym kolagenie [4,5]. Wyśiłki te zostały uwieńczone częściowym sukcesem ponieważ pojawił się poważny problem praktyczny z uzyskaniem handlowego kolagenu typu I taniego i o powtarzalnych właściwościach, co uniemożliwiało kontrolę całej procedury. Dlatego też w prezentowanej pracy zastąpiono kolagen typu I żelatyną roślinną (agar-agar) $[(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n]$ o strukturze polisacharydu. Handlowa żelatyna jest dobrze rozpuszczalna w wodzie i posiada dobrze zdefiniowane właściwości fizyczne i chemiczne [6].

Hydroksyapatyt jest używany często do pokrywania implantów medycznych z tytanu w celu lepszego umocowania a co za tym idzie - wzrostu czasu użytkowania implantu. Celem prezentowanej pracy jest uzyskanie na podłożach metalowych kompozytowej powłoki hydroksyapatytowej z dodatkiem żelatyny przy wykorzystaniu nieskomplikowanej metody zol-żel i niedrogich odczynników. Metoda zol-żel posiada szereg pozytywnych: mikrostrukturę powłok można kształtować przez dobór parametrów chemicznych lub dobór warunków procedury zol-żel. Ponadto, można uzyskiwać cienkie filmy o grubości poniżej mikrona.

Jako prekursorów wapnia i fosforu do sporządzenia zolu użyto czterowodnego azotanu wapniowego i trójwodnego fosforanu amonowego [7,8]. Stosunek zawartości wapnia do fosforu w zolu wynosił od 1.67 do 2.5. Reakcję przeprowadzano w temperaturze pokojowej w środowisku wodnym przy pH od 6.0 do 7.8. Zol HAP-GELATIN przygotowywano przez zmieszanie roztworu azotanu wapniowego (0.164 Mol/dcm^3) z dodatkiem żelatyny i fosforanu amonowego (0.098 Mol/dcm^3). Wartość pH ustalano przez dodatek amoniaku. Uzyskany zol mieszało się na mieszadło magnetycznym przez 2 godziny.

Płytki tytanowe lub ze stopu tytanowego odtłuszczone i wytrawione zanurzano w zolu HAP-GELATIN a następnie wynurzano ze stałą prędkością (20 cm/min). Grubość wytwarzanej warstwy regulowano stosując wielokrotne wynurzanie. Po nałożeniu, świeżą powłokę ostrożnie suszono i wygrzewano w argonie w temperaturze $460-750^\circ\text{C}$. Wyrzeganie usuwa wodę, zagęszcza warstwę i poprawia jej adhezję do podłoża.

Skład fazowy powłok badano metodą fourierowskiej spektroskopii w podczerwieni (FTIR) i metodą dyfrakcji rentgenowskiej. Badania FTIR prowadzono na spektrometrze Biorad FTS60v z przystawką Harricka Seagull. Analizę dy-

SOL-GEL PREPARATION OF HYDROXYAPATITE - GELATIN COMPOSITE LAYERS

STOCH A., DŁUGOŃ E., JASTRZĘBSKI W., ADAMCZYK A.

FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND,
E-MAIL: ANNA.STOCH@POCZTA.ONET.PL

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),53-54]

Bones and teeth are both nanocomposites of minerals and proteins. The minerals are mostly apatites such as hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ (HAP), fluoroapatite and carbonate-apatite [1]. It is well established that the formation of a collagen matrix precedes the deposition of hydroxyapatite what means that this matrix forms and provides a template for the mineral phase [2,3]. Some groups have tried to develop synthetic bone, which was prepared by the reaction of co-precipitation of HAP nanocrystals in soluble collagen [4,5]. These efforts have met partial success and the biggest practical problem with Collagen - type I is its high cost and the poor definition of commercial sources of this material which makes it difficult to follow up on well-controlled processing. Therefore in the present study Collagen-I type was replaced by the agar-agar (natural gelatin) $[(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n]$ precursor. Commercially available gelatin materials show a good water solubility and well defined physical and chemical properties [6].

Hydroxyapatite is frequently used as a coat in titanium medical implants to improve tissue fixation and thus increase the lifetime of the implant. The aim of this work is to obtain the gelatin-containing hydroxyapatite nanocomposite coating on metal substrates using sol-gel route with simple procedures and inexpensive chemicals. Sol-gel method has several advantages: the microstructure of coatings can be modified by changing its chemistry or processing conditions. Additionally, sub-micron thin films can be obtained.

The sol precursor was prepared from calcium nitrate tetrahydrate and triammonium phosphate trihydrate as the calcium and phosphorous sources, respectively [7,8]. The calcium and phosphorous were set to maintain the ratio 1,67 - 2,5. Their reaction was performed at room temperatures in aqueous solutions at pH from 6.0 to 7.8. The HAP-GELATIN sol was prepared by mixing a calcium nitrate water solution (0.164 Mol/dcm^3) with addition of gelatin and ammonium phosphate solution (0.098 Mol/dcm^3). The pH was adjusted with ammonia solution. Resulting colloidal sol was then mixed during 2h with magnetic stirrer.

Titanium or titanium alloy plates, degreased and etched, were dipped in the HAP-GELATIN sol and withdrawn with the constant speed. Thickness of the final deposit was controlled by multiple dipping. After the deposition was completed, the coats "as deposited" were carefully dried and annealed in argon at $460-750^\circ\text{C}$. The heating removed water, densified the layer and improved its adhesion towards the substrate.

The phase composition of coatings was analyzed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and by XRD analysis. FTIR analysis was performed on Biorad FTS60V spectrometer with Harrick Seagull attachment. XRD analysis was performed using X-ray diffractometer X'Pert produced by Philips, with Cu Ka radiation.

Morphology of HAP - GELATIN layers and chemical analysis was performed with scanning electron microscopy

53

fraktograficzną wykonano na dyfraktometrze X'Pert produkcji Philipsa z użyciem promieniowania Cu Ka. Morfologię warstw HAP-GELATIN i ich skład chemiczny badano przy użyciu mikroskopu skaningowego Philips XL 30 z mikroanalizatorem rentgenowskim Link ISIS-EDX.

Wnioski

Stwierdzono, że skład chemiczny i struktura warstw HAP zależy w istotny sposób od pH zolu i od obróbki cieplnej. Najkorzystniejsze wartości pH to zakres 6.5-7.8. Faza apatytowa może się tworzyć nawet w temperaturach tak niskich jak 4600C jednak aby osiągnąć lepsze przekrystalizowanie HAP i wyższy stopień zagęszczenia warstwy konieczne jest wygrzewanie w wyższych temperaturach.

Żelatyna odgrywa pozytywną rolę przy sporządzaniu zolu HAP-GELATIN dla otrzymywania powłok. Żelatyna powoduje wzrost trwałości zolu podczas formowania się amorficznych nanocząstek hydroksyapatytu w wodnym roztworze soli wapnia i magnezu.

Podziękowanie

Autorzy wyrażają wdzięczność Ministrowi Nauki i Informatyzacji za finansowanie tej pracy. Projekt PBZ-KBN-082-T08/2002

Piśmiennictwo

- [1] R. Z. Legeros and J.P. Legeros, "An Introduction to Bioceramics", edited by L.L.Chen and J. Wilson, World Scientific, Singapore 1995, p. 139.
- [2] G.H. Nancollas, "Biological Mineralization and Demineralization", Ed. Springer Verlag, Heidelberg, 1982.
- [3] D.J. Hulkins, Ed. Verlag Chemie, Weinheim, 1984.
- [4] M. Kikuchi, Y. Suetsugu, J. Tanaka, S. Ito, S. Ichinose, K. Shiniyama, Y. Hiraoka, Y. Mandai, S. Nakatani, Bioceramics, 12 (1999) 393-396.

Philips XL 30 with X-Ray microanalyser Link ISIS - EDX.

Conclusions

It was found that chemical composition and structure of HAP layers strongly depend on pH of sol solutions and final thermal treatments. Most favorable pH is in the 6.5-7.8 region. Apatite phase can be formed at temperatures as low as 460°C but much higher temperatures are necessary to achieve better crystallization of HAP and higher density of the layer.

Gelatin plays a positive role during preparation of HAP-GELATIN sol for coating. It enhances the sol stability during the formation of amorphous, nanosized particles of hydroxyapatite from $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ solutions.

Acknowledgement

The financial support the Minister of Science and Information Society Technologies, as a research project No 3 T08D 019 28 project PBZ-KBN-082-T08/2002 is gratefully acknowledged.

References

- [5] M.C.Chang, T. Ikoma, M. Kukuchi, J. Tanaka, J. Mater. Sci. Mat. Med. 13 (2002) 993-997.
- [6] A.G. Word, A. Courts, "The science and technology of gelatin", London, Academic Press 1977.
- [7] C.M.Lopatin, V.B. Pizziconi, Alford, J. Mater. Sci. Mater. Med. 12 (2001) 767-773.
- [8] A. Stoch, W. Jastrzębski, E. Długoń, W. Lejda, B. Trybalska, G. J. Stoch, A. Adamczyk, J. Mol. Struct. 744-747 (2005) 633-640.

BADANIA POWŁOK FOSFORANO- WO-KRZEMIANOWYCH NA POD- ŁOŻU METALICZNYM METODĄ SPEKTROSKOPII W POD- CZERWIENI ORAZ METODAMI RENTGENOWSKIMI

M.ROKITA, M.HANDKE, A.BROŻEK, A.ADAMCZYK,
W. JASTRZĘBSKI

WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA W KRAKOWIE
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),54-57]

Wstęp

Modyfikacja powierzchni, stosowanych jako implanty kości, materiałów metalicznych wydaje się być efektywnym sposobem poprawy jakości połączenia implant-kość. Korzystnymi sposobami nakładania powłok na implanty są

IR SPECTROSCOPY AND XRD STUDIES OF PHOSPHO-SILICATE LAYERS ON THE METAL BASE

M.ROKITA, M.HANDKE, A.BROŻEK, A.ADAMCZYK,
W. JASTRZĘBSKI

FACULTY OF MATERIAL SCIENCE AND CERAMICS
AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),54-57]

Introduction

Metal materials such as stainless steel or titanium and its alloys are commonly used as the bone implants. The modification of metal materials surface seems to be the effective method of improvement of implant - bone joint quality. The methods which do not require the high temperature treatment of the covered implant (for example sol-gel, electrophoresis or biomimetic method) are one of the most advantageous way of layers setting [1]. The layer improve

metody nie wymagające wysokotemperaturowej obróbki termicznej pokrytego implantu, takie jak metoda zol-żel, elektroforeza czy metoda biomimetyczna [1]. Powłoka poprawia właściwości biologiczne implantu, nie wpływając na jego właściwości mechaniczne. Naniesienie powłoki minimalizuje negatywne oddziaływania na granicy tkanka - implant, zmniejsza ryzyko powstawania stanów zapalnych na granicy, oraz uaktywnia powierzchnię biologicznie i umożliwia wytworzenie wiązań chemicznych pomiędzy implantem a żywą tkanką, co w konsekwencji powoduje lepsze zaktwiczenie implantu w kości. Jednocześnie powłoka stanowi swoistą barierę zapobiegającą przenikaniu substancji szkodliwych z metalicznego implantu do żywej tkanki [2]. Powłoki mogące spełniać powyższe funkcje powinny się cechować trwałością, odpornością chemiczną w środowisku agresywnym, jakim są płyny fizjologiczne żywego organizmu, odpornością na ścieranie i szczelnością, a równocześnie wykazywać właściwości bioaktywne (najczęściej wstępnie określane na podstawie zdolności narastania na jej powierzchni hydroksyapatytu). O właściwościach powłoki decyduje przede wszystkim jej skład chemiczny, sposób nanoszenia, struktura i grubość.

Preparatyka

Powłoki nanoszono na kształtki ze stopu tytanu (Ti90/Al6/V4) metodą zol-żel i metodą biomimetyczną [3]. Metoda zol-żel, polegająca na nakładaniu metodą wynurzeniową ze stałą prędkością jedno lub wieloskładnikowego zolu, sporządzonego najczęściej na bazie organicznych pochodnych, umożliwia sporządzenie powłok na różnorodnych materiałach, niezależnie od ich kształtu. W wyniku postępującej hydrolizy i polikondensacji zolu oraz odparowania rozpuszczalnika powłoka formuje się i zagęszcza już w trakcie wynurzenia, w temperaturze pokojowej. Docelową zwartość i przyczepność powłoki uzyskiwano w wyniku usunięcia rozpuszczalnika i resztek organicznych w procesie obróbki termicznej w temperaturach nie wyższych niż 600°C. Zaletą metody zol-żel jest możliwość zastosowania zoli o różnorodnych składach oraz uzyskania bardzo czystych, jednorodnych powłok na rozmaitych podłożach. Grubość, przyczepność i zwartość warstw regulowano poprzez skład, stężenie i lepkość zolu, dobór warunków zagęszczania oraz wielokrotne nanoszenie zolu/zoli na podłoże. Stosowano również modyfikację nanoszonego zolu, poprzez wprowadzenie do niego cząstek stałych hydroksyapatytu.

Metoda biomimetyczna polega na termostataowaniu implantu pokrytego powłoką w syntetycznym osoczku (SBF) w temperaturze 37°C, symulującym warunki naturalnego wzrostu kości. SBF jest środowiskiem agresywnym, w związku z czym na skutek kontaktu implantu pokrytego powłoką ze sztucznym osoczkiem, obok lub zamiast pożądanego zjawiska narastania hydroksyapatytu, może występować rozpuszczanie powłoki, złuszczenie się powłoki lub wytrącanie związków innych niż hydroksyapatyt (np.: chlorków). Tym samym biomimetyczny wzrost hydroksyapatytu traktowany był jako główne wstępne kryterium sprawdzające jakość powłoki i jej właściwości bioaktywne [4].

Do badań wytypowano powłoki fosforanowo-krzemianowe sporządzone z zoli o następujących składach:

- seria a - zol $20\text{NaCaPO}_4\cdot 80\text{SiO}_2$,
- seria b - zol SiO_2 z dodatkiem naturalnego hydroksyapatytu,
- seria c - zol $20\text{NaCaPO}_4\cdot 80\text{SiO}_2$ z dodatkiem naturalnego hydroksyapatytu.

Otrzymane powłoki poddano badaniom, mającym na celu określenie składu chemicznego i fazowego, krystaliczności bądź amorficzności powłok oraz ich morfologii. Ocenę kry-

the biological properties of implant and didn't worse its mechanical features. The covered layer decrease the negative influence on the implant-bone border, reduce the risk of inflammatory state on the border and activate the surface biologically as well as enable formation of chemical bonds between the implant and alive tissue (as a consequence the implant is better joined with bone). At the same time the layer is a kind of specific barrier which prevent the harmful substances penetration from metallic implant to alive bone [2]. The layers which can be satisfied should be stable, chemically resistant in the aggressive medium such as physiological salt solution and hermetic as well as be biologically active. Biological activity is usually temporarily estimated on the base of hydroxyapatite growth possibility. The chemical composition, the way of deposition, structure and thickness of the layer are the main parameters which decide about layers properties.

Experimental

Te layers were deposited on the titanium alloy (Ti90/Al6/V4) base using sol-gel and biomimetic method [3]. The sol gel method is based on depositing by rising from one or multicomponent sol with the constant speed. The sols are usually prepared on the base of organic precursors of desirable oxides. The method enable to obtain the layers on different bases irrespective of their shape. The layer forms and condense as the result of hydrolysis, polycondensation of the sol and evaporation of dissolvent during rising process, in the room temperature. The final density and adhesion the layer obtains during heat treatment in the temperatures not higher than 600°C. The possibility of different composition sols application and obtaining the very pure and homogeneous layers on different types of base materials are the main advantage of sol-gel method. The thickness, adhesion and density of the layers were regulated by composition, concentration and viscosity of sol, condense conditions choice as well as repeated deposition of sol (sols) on the base material. The modification of deposited sol, by the addition of fine crystalline hydroxyapatite, was applied too.

The biomimethic method is based on keeping the implant in synthetic body fluid (SBF) in temperature of 37°C. The process simulates the natural bone growth conditions in the aggressive medium. Beside or in place of expecting process of hydroxyapatite growth the dissolution or peeling of the layer, and some other compositions (for example chlorates) growth is possible as a result of implant contact with SBF. This is the reason why biomimetic growth of hydroxyapatite was treated as preliminary test of biological activity of the layer [4].

The following phosphor-silicate layers were selected to later work:

- series a - layers obtained from $20\text{NaCaPO}_4\cdot 80\text{SiO}_2$ sol,
- series b - layers obtained from SiO_2 sol with the addition of fine crystalline natural hydroxyapatite,
- series c - layers obtained from $20\text{NaCaPO}_4\cdot 80\text{SiO}_2$ sol with the addition of fine crystalline natural hydroxyapatite.

The obtained layers were examined in order to define their chemical and phase composition, crystallinity or amorphism and the morphology. The estimation of crystallinity or amorphism of layers and, in some cases, fixing their phase composition was made on the base of X-ray diffraction method. The X-ray diffraction measurements enable to define the phase composition of crystalline materials in the form of powder or layers on different bases. The measurements were made using X'Pert Philips and FPM Seifert XRD7 diffractometer (monochromatic radiance with wave

staliczności bądź amorficzności powłok oraz w przypadku niektórych powłok określenie ich składu fazowego prowadzono metodą dyfrakcji rentgenowskiej. Pomiary rentgenograficzne (XRD) umożliwiają identyfikację fazowych materiałów krystalicznych w formie proszkowej, litej oraz cienkich warstw na różnorodnych podłożach. Pomiary przeprowadzono przy pomocy dyfraktometrów X'Pert firmy Philips oraz FPM Seifert XRD7 (w obu przypadkach stosowane jest promieniowanie monochromatyczne o długości fali 1.5418 Å, odpowiadające linii CuK_α , detekcja - licznik scyntylicyjny). Badania powłok przeprowadzono w dwóch wariantach: badając powłokę nałożoną na podłoże (metoda proszkowa lub GID) lub badając sam materiał zdrapany z powłoki (metoda proszkowa). Ze względu na niską krystaliczność lub amorficzność powłok oraz wysoką krystaliczność podłoża badania prowadzone na próbkach typu warstwa na podłożu metalicznym są najczęściej mało czytelne. Z tego powodu do badania powłok na metalach wykorzystany został zespół optyki wiązki równoległej (GID), w skład którego wchodzi szczelina Sollera oraz monochromator na wiązce ugiętej. Wydłużenie drogi wiązki w warstwie poprzez zastosowanie stałego, niskiego ($\omega=1-3^\circ$) kąta padania, pozwala na polepszenie stosunku intensywności refleksów związanych z samą warstwą do intensywności refleksów związanych z podłożem, a tym samym na identyfikację fazową materiału warstwy w przypadku jej niskiej krystaliczności. Spektroskopia w podczerwieni (IR) jest nieniszczącą metodą umożliwiającą badanie powłok, zarówno krystalicznych jak i amorficznych, na różnorodnych podłożach. Zakres badań obejmował głównie: analizę fazową powłok na różnych podłożach, rozróżnianie faz krystalicznych i amorficznych, identyfikację ugrupowań OH^- i H_2O czy grup węglanowych wbudowanych w strukturę powłoki itd., przy pomocy w spektrometrów fourierowskich BioRad: FIR-FTS60v, MIR-FTS60v, Excalibur z mikroskopem UMA500, NIR-MIR FTS6000 z przystawką ramanowską i laserem Nd-YAG. Morfologia otrzymanych powłok, ocena ich homogeniczności oraz szacunkowa mikroanaliza chemiczna powłok wykonana została z zastosowaniem mikroskopu scanningowego z przystawką do mikroanalizy rentgenowskiej (FEI/Philips ESEM XL30 TMP z EDX-EDAX (BSE - detektor Centaurus)).

Dyskusja wyników

Analiza rentgenogramów otrzymanych powłok wykazała, że powłoki te mają charakter drobnokrystaliczny, ze znaczną domieszką fazy amorficznej (zwłaszcza w przypadku serii b). Na podstawie wyników badań przeprowadzonych techniką GID można przypuszczać, że dominującymi fazami krystalicznymi w próbkach serii a oraz c są krzemiany i fosforany wapnia, natomiast w próbkach serii b fosforany wapnia. Pomiary rentgenowskie przeprowadzono ponownie dla każdej próbki po cyklu termostatowania w sztucznym osoczu (SBF) oraz po wygrzaniu termostatowanych powłok w temperaturze 600°C . Rentgenogramy wszystkich próbek po termostatowaniu w SBF wskazują na obecność w próbkach fosforanów wapnia (ze względu na niską krystaliczność nie można stwierdzić, czy jest to jedna faza, czy mieszanina kilku fosforanów). W wyniku wygrzewania próbek na rentgenogramach pojawiają się piki charakterystyczne dla hydroksyapatytu. Analiza zdjęć z mikroskopu scanningowego i mikroanalizy punktowej pozwala na potwierdzenie powyższych wniosków. Aby w pełni potwierdzić, że na wszystkich badanych powłokach następuje wzrost hydroksyapatytu (bądź apatytu) w warunkach termostatowania w SBF porównywano widma w podczerwieni powłok przed i po termostatowaniu (RYS.1). Obecność

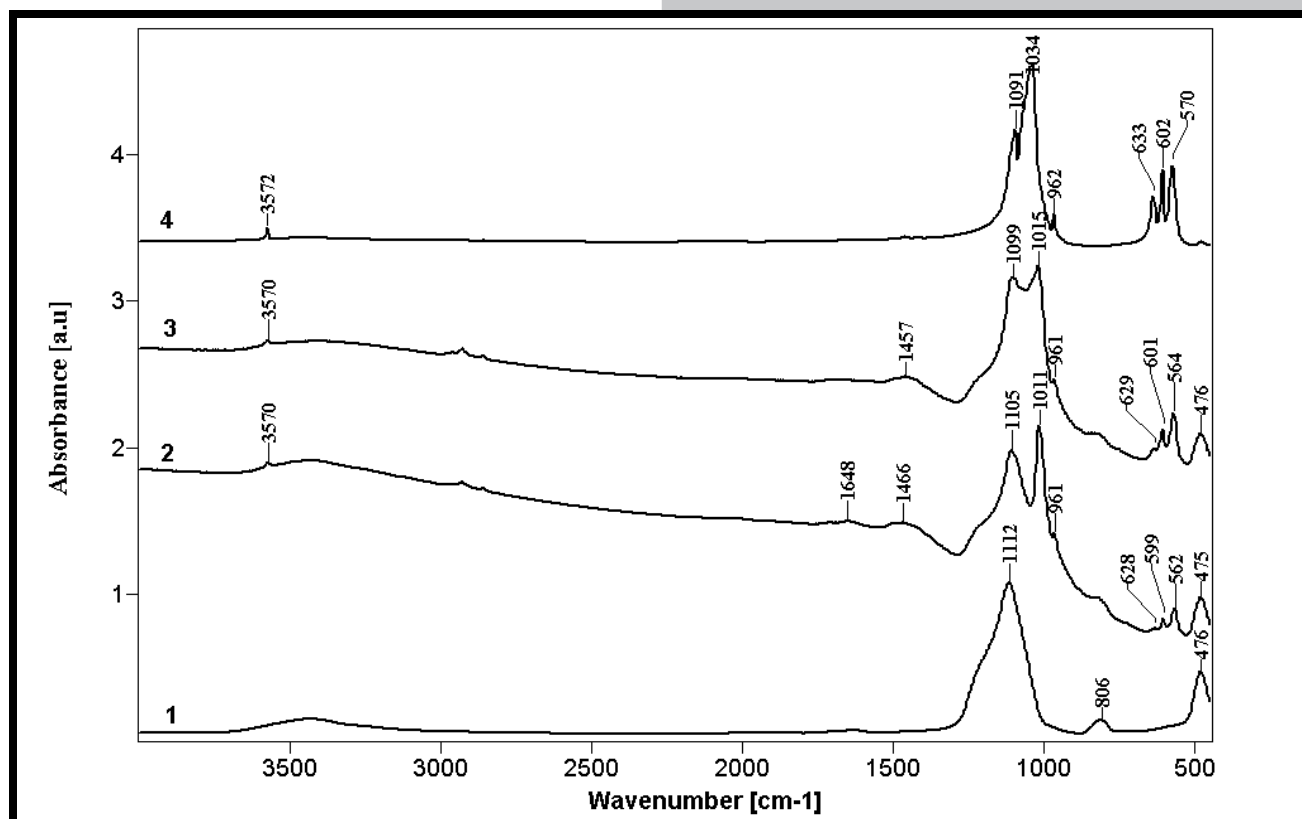
length of 1.5418 Å - CuK_α line; scintillating counter). The two variants of measurements were realised: for the layer on the base material (GID and powder method) and for the powdered layer scraped from the base (powder method). The measurements of ceramic layer on the metallic base are usually illegible because of very low crystallinity of layers and high crystallinity of the base. Therefore the parallel incident beam optics (grazing incidence diffraction - GID method) with Soller slits and the monochromator on the diffracted beam was used to examine the layers on metal base. The extension of the beam way in layer, obtained through using constant low glancing angle ($\omega=1-3^\circ$), enable to improve the ratio of peaks connected with the same layer intensity to the peaks due to base material intensity. The used method makes it possible to identify the phases in the layer of low crystallinity.

The infrared spectroscopy enables the investigation of layers on the different bases, independently of their crystallinity. The range of works included the phase analysis of layers deposited on different base materials, the identification of crystalline and amorphous phases, discernment of OH^- i H_2O or carbonate groups built in layer structure, using BioRad fourier diffractometers: FIR-FTS60v, MIR-FTS60v, Excalibur with microscope UMA500 and NIR-MIR FTS6000 with Raman equipment and Nd-YAG laser.

The morphology, homogeneity and estimated chemical microanalysis were made using FEI/Philips ESEM XL30 TMP z EDX-EDAX scanning microscope with X-ray microanalysis detector (BSE - detektor Centaurus).

Results and discussion

The analysis of X-ray diffraction patterns showed that the layers are fine crystalline with the addition of amorphous phase (especially in case of series b). On the base of GID method results one can suppose that silicates and calcium phosphates in case of series a and c while only calcium phosphates in case of series b are the main phases in the samples. The X-ray measurements were made again after keeping in SBF as well as after heat treatment in temperature of 600°C . All the X-ray patterns for the samples after keeping in SBF shows the peaks characteristic for calcium phosphates. Because of low crystallinity it is impossible to check if there is only one type of calcium phosphate or the mixture of similar structure phosphates in the samples. After the samples heating process the peaks characteristic for hydroxyapatite can be observed on almost all X-ray diffraction patterns. The analysis of scanning microscope pictures and X-ray point microanalysis results enable to confirm the above conclusions. The next stage of the work led to confirm the hydroxyapatite (or any kind of apatite) growth during SBF keeping process. The IR spectroscopy spectra for the samples before and after keeping in SBF were compared. The presence of bands at about 565, 600, 1035 cm^{-1} testify to presence of apatite in the layers. If hydroxyapatite is formed we can observe additionally the bands at about 630 and 3570 cm^{-1} . The bands in the range of 1400-1650 cm^{-1} confirm the carbonate groups presence. On the example of selected sample of a series (FIG.1) we can observe the growth of intensity of the bands connected with hydroxyapatite after keeping in SBF (spectrum 3). This result confirm the bioactive properties of deposited layer. The spectra of amorphous silica gel (spectrum 1) and crystalline synthetic hydroxyapatite (spectrum 4) are presented to. The analogous results, confirming the hydroxyapatite growth, were obtained in case of samples of all series.



apatytu potwierdza obecność na widmach w zakresie środkowej podczerwieni pasm przy ok. 565, 600, 1035 cm^{-1} . Jeżeli wykształca się hydroksyapatyt dodatkowo na widmie pojawiają się pasma przy ok. 630 i 3570 cm^{-1} . Pasma w zakresie 1400 - 1650 cm^{-1} świadczą o obecności grup węglanowych w wykształconym apatycie. Na przykładzie widm wybranej próbki serii a (RYS.1) można zaobserwować wzrost intensywności pasm charakterystycznych dla hydroksyapatytu po termostatowaniu w SBF, co potwierdza bioaktywne właściwości naniesionej powłoki. Dla porównania na rysunku umieszczono widmo czystego amorficznego żelu krzemionkowego (1) oraz syntetycznego, krystalicznego hydroksyapatytu (4). Analogiczne wyniki, potwierdzające narastanie apatytu (nie zawsze wykształconego hydroksyapatytu), otrzymano dla próbek pozostałych serii.

Wnioski

1. Opracowano procedurę otrzymywania klarownych i stabilnych w czasie zoli krzemianowych (o różnym stężeniu SiO_2) i krzemianowo - fosforanowych oraz zoli z dodatkiem naturalnego hydroksyapatytu.
2. Obserwacje i badania powłok otrzymanych z tych zoli wskazują na możliwość korzystnej pod względem biologicznym modyfikacji podłoża. Otrzymane powłoki są amorficzne lub drobnokrystaliczne (badania XRD), na podstawie badań w podczerwieni oraz badań pod mikroskopem scanningowym można stwierdzić, że w czasie termostatowania następuje bardzo powolne narastanie amorficznych fosforanów wapnia. Powłoki wykazują lepsze własności (pryczepność, mniej spękań) w przypadku wielokrotnego nakładania powłoki na podłoże i wydłużenia czasu suszenia powłoki pomiędzy jednym a drugim nakładaniem warstwy.

Podziękowania

Praca jest finansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji w ramach grantu KBN nr PBZ/KBN-082/T08/2002.

RYS. 1. Widma spektroskopowe w podczerwieni:
1) żelu krzemionkowego, 2) próbki serii a, 3) próbki serii a po termostatowaniu w SBF, 4) krystalicznego hydroksyapatytu.

FIG. 1. IR spectra of: 1) silica gel, 2) a series sample, 3) a series sample after keeping in SBF, 4) crystalline hydroxyapatite.

Conclusions

1. The procedure of clear and time stable silicate and phospho-silicate sols with the addition of natural hydroxyapatite was prepared.
2. All the measurements and observations show that the layers obtained from the prepared sols can advantageously modify the biological surface properties of the implants. The obtained layers are amorphous or fine crystalline (XRD measurements). The growth of apatite on the implant surface, after keeping in SBF is observed on the base of IR spectroscopy and scanning microscopy measurements. Better properties of the layer (better adhesion, the less amount of cracks) can be obtained through several times sol depositing and elongation of drying time during deposition process.

Acknowledgement

This work is supported by the Minister of Science and Information Society Technologies under grant no. PBZ/KBN - 082/T08/2002.

Piśmiennictwo

References

- [1] E. Jallot, *J. Adv. Mater.* 35 (2003) 9.
- [2] A. J. Salinas, M. Vallet-Regí, I. Izquierdo-Barba, *J. Sol-Gel. Sci. Technol.* 21 (2001) 13.
- [3] Stoch A, W. Jastrzębski, E. Długoń, W. Lejda, B. Trybalska, A. Adamczyk *J. Mol. Structure*, 744-747 (2005) 633.
- [4] M. Rokita, A. Brożek M. Handke *J. Mol. Struct.* 744-747 (2005) 589.

BADANIA RENTGENOGRAFICZNE ŻELI I POWŁOK KRZEMIANOWYCH I KRZEMIANOWO- FOSFORANOWYCH

A. ADAMCZYK, M. HANDKE, M. ROKITA, A. BROŻEK
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI AGH
30-059 KRAKÓW, AL. MICKIEWICZA 30

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),58-60]

Współczesna medycyna korzysta w bardzo szerokim zakresie z różnego typu implantów, wśród których szeroką grupę stanowią implanty tytanowe oraz z pochodnych stopów tytanowych. Aby wprowadzenie implantu, czyli obcego elementu, do organizmu mogło przynieść oczekiwane, korzystne rezultaty, musi on spełniać wiele wymagań, wśród których jednymi z ważniejszych są dobre przyleganie otaczających implant tkanek do jego powierzchni oraz jego bioaktywność. Wymienione właściwości mogą być modyfikowane poprzez pokrywanie implantów różnorodnymi powłokami w trakcie takich procesów jak: napylenie plazmowe, elektroforeza czy metoda zol-żel. Coraz częstsze wykorzystanie tej ostatniej podyktowane jest znacznymi możliwościami modyfikowania właściwości nakładanych warstw poprzez zmianę ich składu chemicznego, a co za tym idzie zmiany struktury powłoki i jej składu fazowego. Metoda zol-żel umożliwia również nakładanie sekwencji warstw w celu polepszenia wytrzymałości mechanicznej powłoki, zwiększenia przyczepności między powłoką a powierzchnią implantu czy zainicjowania jej bioaktywności. Warto także przypomnieć o znacznie niższych temperaturach, w jakich otrzymuje się ceramiczne powłoki żelowe w porównaniu z innymi technikami (badane warstwy wygrzewane były w temperaturach nie przekraczających 900°C).

Jak można zaobserwować, ważnym etapem badania powłoki jest zdefiniowanie jej składu fazowego i struktury, pozwalające wyciągać, na podstawie obecności konkretnych faz, wstępne wnioski na temat takich cech jak wytrzymałość mechaniczna, odporność chemiczna, bioaktywność czy określić stopień przekształcania warstwy (lub jej amorficzność). W celu przeprowadzenia analizy fazowej materiałów krystalicznych syntezowanych w postaci powłok na różnego typu podłożach, najkorzystniej jest zastosować niskokątowe pomiary rentgenograficzne otrzymywane z wykorzystaniem optyki wiązki równoległej (konfiguracja GID). Przyjęcie stałego, niewielkiego kąta padania ω ($\omega \leq 3^\circ$) pozwala wydłużyć drogę wiązki padającej w warstwie powierzchniowej materiału, a więc w badanej powłoce, co prowadzi do zminimalizowania efektów pochodzących od samego podłoża. W rezultacie na dyfraktogramie dominują refleksy związane z powłoką przy jednoczesnym obniżeniu intensywności bądź całkowitym wyeliminowaniu refleksów pochodzących od podłoża. Jest to również ważne z powodu najczęściej niskiego stopnia krystaliczności powłok bądź obecności fazy amorficznej, co również wpływa na pogorszenie jakości mierzonego dyfraktogramu.

Do syntezowania powłok, badanych w niniejszej pracy stosowano jako wyjściowe następujące komponenty: alkoholowy roztwór azotanu wapnia, zol krzemionkowy, zol cyrkonowy oraz zol krzemionkowy z roztworem azotanu wapnia i prekursorem fosforu. Powłoki otrzymywano metodą zol-żel poprzez nałożenie trzech warstw, przy czym przed nałożeniem kolejnej warstwy poprzez zanurzenie próbki w odpowiednim zolu poprzednia warstwa była suszona przez 15 minut. Kolejnym etapem było wygrzewanie warstw w temperaturach dochodzących maksymalnie do 900°C przez

THE X-RAY STUDIES OF SILICATE AND PHOSPHOSILICATE GELS AND COATINGS

A. ADAMCZYK, M. HANDKE, M. ROKITA, A. BROŻEK
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS
AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 CRACOW, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),58-60]

The contemporary medicine make use of different type implants very widely, among which titanium and titanium alloys ones create a large group. If the implantation of a strange element is to bring positive results, the implant should fulfill a lot of requirements, among which two are very important: a good adhesion of surrounding tissues to the implant surface and its bioactivity. The properties mentioned above can be modify by covering of the implant surface with different type coatings during processes as plasma spraying, electrophoresis or sol-gel method. The last one is used more and more often because of large possibilities of properties modification of coatings by their chemical composition changes and thus changes in structure and phase compositions of coatings synthesized. The sol-gel method also enables to apply a few coatings in order to improve a mechanical strength and an adhesion as well as to initiate a bioactivity of an implant surface. It is also worth to recall of much lower temperatures of synthesis in sol-gel method in comparison with other processes (the layers studied were annealed up to 900°C).

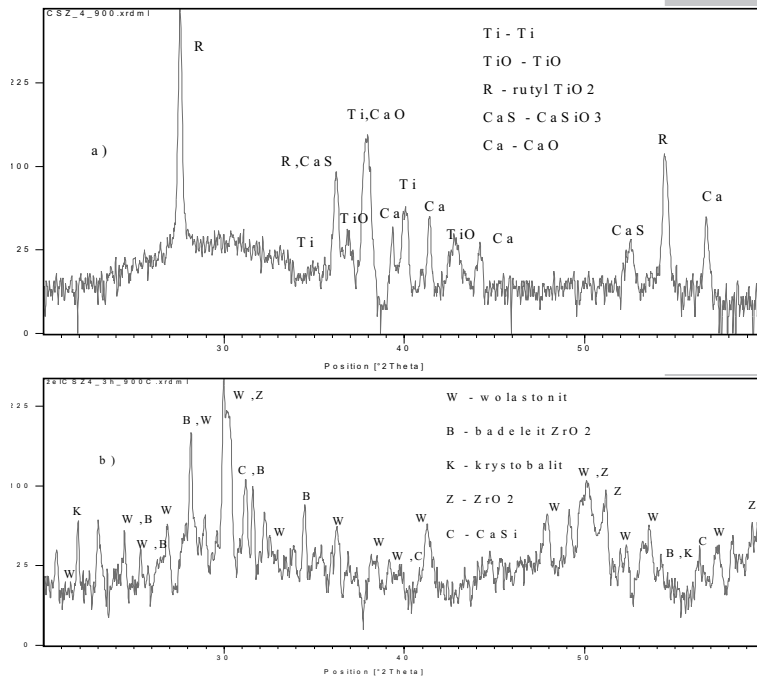
As one can observe, the examination of a structure and a phase composition of coating is an important stage, allowing to draw initial conclusions on properties like a mechanical strength, a chemical resistance, a bioactivity or a crystallization rate of coating, basing on the presence of particular phases.

To conduct a phase analysis of material in form of coating on different type of base obtained, one can use a parallel beam optics (GID configuration). The applying of a stable incident angle ω ($\omega \leq 3^\circ$) allows to elongate the incident beam path in the superficial layer what results in the minimization of base effects. Thus peaks due to the coating predominate in the diffraction patterns simultaneously with the reducing of an intensity of peaks connected with the base. The elongation of beam path is also important because of poor crystallization or the presence of amorphous phase in the coating as a rule, what can also influence on the XRD pattern quality.

As raw materials for samples studied in this work, the following components were used: silica sol, zirconia sol, alcohol solution of calcium nitrate, and silica sol with calcium nitrate and Ca precursor. The layers were obtained using sol-gel method, by three times coat deposition. Each deposit was dried in 15 minutes before the next coating by dipping the sample in the proper gel. Then the whole coating was annealed up to 900°C in 3 to 6 hours. In this way prepared samples were then examined by GID (grazing incidence reflection) measurements with $\omega=1.5^\circ$ in the range of 20-60° [2 θ]. At the same time, the gel samples of analogical compositions, under the same conditions, were obtained in the form of powders of a different grainings.

The phase analysis was also carried out for this type of material basing on a standard DSH method measurements. The comparison of phase analysis of selected coating and analogical gel samples is shown in the FIG.1.

In the diffraction pattern of the layer (FIG.1a), the reflec-



RYS. 1. Porównanie dyfraktogramów: dla powłoki (a); dla próbki o analogicznym składzie otrzymanej w postaci proszku(b). FIG. 1. The comparison of the diffraction patterns: of coating (a); of powder gel sample of analogical composition (b).

tions due to the base predominate in spite of measurement conditions - these are reflections connected with titanium containing phases.

The background raised in the range of 25-35° [2θ] suggests the significant presence of amorphous phase in a layer, additionally one can observe a few peaks due to CaO. In case of powder gel sample, the variety of phases crystallized during the annealing process is bigger (FIG.1b), two of them: wollastonite and the mixture of monoclinic and regular forms of zirconia are desired because of the properties connected with them [1,2].

As mentioned at the beginning of this abstract, both gels and coatings were annealed in argon atmosphere and in the air. The influence of annealing conditions on phases obtained were checked for a few

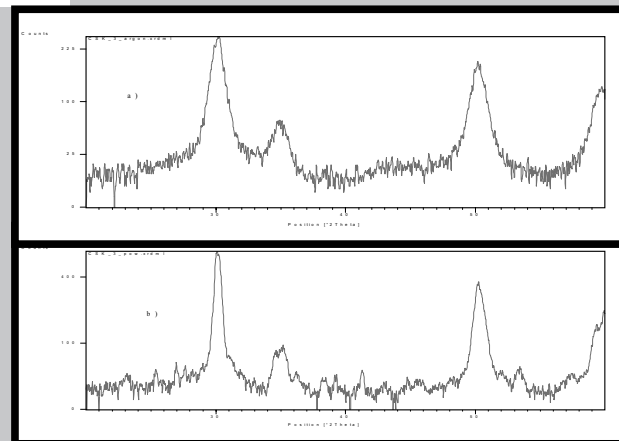
3 do 6 godzin w atmosferze argonu lub w powietrzu. Dla tak otrzymanych powłok przeprowadzono niskokątowe pomiary rentgenograficzne w zakresie 20-60° [2θ] przy stałym kącie padania $\omega=1.5^\circ$. Równocześnie zsyntezowano w takich samych warunkach żelowe próbki o analogicznych składach, ale w postaci proszków o różnym stopniu uziarnienia.

Dla proszkowych materiałów żelo-pochodnych również przeprowadzono analizę fazową w oparciu o standardowe pomiary metodą proszkową DSH. Porównanie analizy fazowej dla wybranych próbek żelowych oraz w postaci powłok przedstawiono na RYS.1.

Na dyfraktogramie otrzymanym dla warstwy (RYS.1a) dominują, pomimo zastosowanych warunków pomiarowych, efekty związane z podłożem - są to refleksy dla faz zawierających tytan. Podniesione tło sugeruje natomiast znaczny udział fazy amorficznej w warstwie, dodatkowo można zaobserwować pojawienie się kilku najmocniejszych refleksów dla tlenku wapnia CaO. W przypadku proszkowej próbki żelowej różnorodność krystalizujących w trakcie wygrzewania faz jest znacznie większa, pojawiają się dwie najbardziej pożądane ze względu na właściwości nadawane syntezowanym materiałom tj. wollastonit oraz mieszanina tlenków cyrkonu krystalizujących w układzie jednoskośnym oraz regularnym [1,2].

Jak już wcześniej podano, powłoki i proszki wygrzewane były zarówno w atmosferze argonu, jak i w powietrzu. Dla wybranych składów sprawdzono wpływ atmosfery wygrzewania na strukturę syntezowanych powłok, jak również otrzymanych proszków (RYS.2). Analiza dyfraktogramów potwierdziła obecność tlenku cyrkonu ZrO_2 w obydwóch wygrzewanych proszkach - co sugerują refleksy przy około 30°, 35°, 50° oraz 60° [2θ], przy czym jest to prawdopodobnie mieszanina dwóch odmian: tetragonalnego i regularnego ZrO_2 , nie zaobserwowano natomiast obecności jednoskośnej formy tej fazy [1,2]. W próbce wygrzewanej w powietrzu widoczne są także refleksy pochodzące od wollastonitu (RYS.2a), nie występujące na dyfraktogramie próbki wygrzewanej w argonie. Wskazuje to na tendencję do krystalizacji wollastonitu czyli fazy odpowiedzialnej za bioaktywność powłoki, właśnie w próbkach wygrzewanych w powietrzu.

W przypadku powłok dalsze badania będą prowadzone w kierunku opracowania takich warunków syntezy oraz składów, które pozwolą na otrzymanie powłoki o wysokiej bio-



RYS. 2. Porównanie dyfraktogramów dla próbek proszkowej wygrzewanej do 900°C w argonie (a); dla próbki o tym samym składzie wygrzewanej do 900°C w powietrzu (b).

FIG. 2. The comparison of diffraction patterns of powder gel sample annealed in argon up to 900°C (a); of powder sample of the same composition annealed up to 900°C in air (b).

coatings and gels selected (FIG.2). The XRD patterns analysis confirms the presence of zirconia in both powders heated - what is suggested by the reflections at about 30°, 35°, 50° and 60° [2θ], and it is probably the mixture of tetragonal and regular forms of zirconia while a monoclinic ZrO_2 is not observed [1,2].

In the air-annealed samples one can observe peaks connected with wollastonite (FIG.2a), not observed in the XRD pattern of sample in argon annealed. This indicates the tendency of wollastonite crystallization in air-annealed sample, which is responsible for the layer bioactivity.

In case of coatings, the further studies will concentrate on developing of such synthesis condition and chemical compositions, which enable to obtain layers of high bioactivity and good mechanical strength, with zircon containing phases connected.

The similar studies have been carried out for the hydroxyapatite phase containing coatings, on titanium and its alloys implants deposited [3].

aktywności, cechującej się jednocześnie dobrą wytrzymałością mechaniczną, związaną z kolei z obecnością faz zawierających cyrkon.

Analogiczne badania przeprowadzone zostały i są nadal kontynuowane dla powłok zawierających fazę hydroksyapatytową, nakładanych na implanty z tytanu oraz jego stopów [3].

ODDZIAŁYWANIE NANOPOWŁOK KRZEMIONKOWO-TYTANOWYCH ZE STOPEM DENTYSTYCZNYM REMANIUM 2000

ANNA STOCH*, JERZY STOCH**, MACIEJ MIKOŁAJCZYK**, ELŻBIETA DŁUGOŃ*

*AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

**INSTYTUT KATALIZY I FIZYKOCHEMII POWIERZCHNI,
POLSKA AKADEMIA NAUK,
UL. NIEZAPOMINAJEK 8, 30-239 KRAKÓW

[Inżynieria Biomateriałów, 47-535,(2005),60-62]

Wprowadzenie

Tytan i jego stopy, jak i inne metale cechuje wytrzymałość, sztywność, twardość i odporność na uderzenie, czyli są to właściwości które są szczególnie ważne dla zastosowań w protetyce stomatologicznej jak również w urządzeniach pracujących pod dużym obciążeniem jak np. w protezach stawowych. W medycynie i stomatologii zwykle używa się: czysty tytan (cpTi) i jego stopy (przeważnie Ti-6Al4V, Ti-Al-Nb), stopy kobaltu (głównie Co-Cr-Mo, Co-Ni-Cr-Mo, Co-Cr-W-Ni), stal nierdzewną, np. typu 316L, stopy Ni-Ti, metale bazujące na złocie, amalgamat dentystyczny (stopy Ag-Sn) [1].

W procesie przygotowywania metalowych aparatów protezycznych, na początku ich powierzchnię się piaskuje a następnie licuje się porcelaną w podwyższonej temperaturze. W rezultacie obróbki termicznej, pomiędzy porcelaną a metalem wytwarza się warstwa pośrednia. Istnienie tej warstwy jest konieczne dla uzyskania dobrej adhezji porcelany pomiędzy porcelaną a metalem. Jednakże czasem zdarza się, że taka warstwa nie powstanie i porcelana odpada. W celu wykreowania warunków dobrej adhezji, w prezentowanych badaniach próbki stopu kobaltowego (Remanium 2000) zostały pokryte powłoką krzemionkowo-tytanową metodą zol-żel [2,3], po czym zostały wygrzane w temperaturze 850°C a następnie licowane porcelaną. W ten sposób wytworzono nową warstwę pośrednią pomiędzy metalem i porcelaną. Warstwa krzemionkowo-tytanowa, podczas wygrzewania funkcjonuje jako warstwa łącząca (joint layer) pomiędzy metalem a porcelaną co zapewnia dobrą adhezję porcelany do metalu.

Celem tej pracy jest badanie zmian jakie zachodzą w warstwie krzemionkowo-tytanowej nałożonej na stop kobaltowy podczas wygrzewania w temperaturze 850°C. Oczeku-

Piśmiennictwo

References

- [1] R. C. Pullar, M. D. Taylor, A. K. Bhattacharya, "The manufacture of partially-stabilised and fully-stabilised zirconia fibres blow spun from an alkoxide derived aqueous sol-gel precursor", *J. of the Europ. Soc.* 21 (2001) 19-17.
- [2] R. Guinebreiere, A. Dauger, A. Lecomte, H. Vesteghem "Tetragonal zirconia powders from the zirconium n-propoxide-acetylacetone-water-isopropanol system".
- [3] A. Stoch, W. Jastrzębski, E. Długoń, W. Lejda, B. Trybalska, G. J. Stoch, A. Adamczyk "Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium and its alloy Ti6Al4V" *J. Mol. Str.* 744-747 (2005) 633-640.

SILICA - TITANIA NANODEPOSITS INTERACTION WITH DENTAL ALLOY REMANIUM 2000

ANNA STOCH*, JERZY STOCH **, MACIEJ MIKOŁAJCZYK**, ELŻBIETA DŁUGOŃ*

*AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW
**INSTITUTE OF CATALYSIS AND SURFACE CHEMISTRY,
POLISH ACADEMY OF SCIENCES,
UL. NIEZAPOMINAJEK 8, 30-239 KRAKÓW

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),60-62]

Introduction

Titanium and its alloys, like other metals have the attributes of strength, stiffness, toughness and impact resistance, properties which are accurately important for dental and for load - bearing applications such as total joint replacements. Major metals used in medical and dental applications today include: commercially pure titanium (c.p. Ti) and its alloys (largely Ti-6Al-4V, Ti-Al-Nb), cobalt-based alloys (primarily cast Co-Cr-Mo, Co-Ni-Cr-Mo, Co-Cr-W-Ni), stainless steel (primarily type 316L), Ni-Ti alloys, Au-based materials and dental amalgam (Ag-Sn alloys) [1]. In the preparation course of metal prosthetic devices, their surface initially is sand-blasted and then, is faced with ceramic porcelain at elevated temperatures. As a result of its thermal hardening, an intermediate layer between ceramic porcelain and metal is formed. This layer is necessary for good adhesion between porcelain and supporting metal. However, sometimes it is not well developed and then, the porcelain gets detached. In order to create conditions of good adhesion, in this study cobalt alloy (Remanium 2000) samples were pre-coated with the silica - titania coating using sol-gel technique [2,3], then they were heated at 850°C and faced with dental porcelain. So, new interface between cobalt alloy and dental porcelain was produced. During its thermal treatment silica-titania layer acts as a joint layer between metal and porcelain.

The aim of presented work was to study changes in chemical state of silica - titania coatings on cobalt alloy samples after firing at elevated temperature (850°C). Chemical interaction between supporting metal and silica - titania layer was expected. The surface composition and relative element contents in the silica- titania layer after firing was studied by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).

je się, że ma tutaj miejsce reakcja chemiczna pomiędzy podłożem a składnikami powłoki krzemionkowo-tytanowej. Skład powierzchni tej warstwy oraz względną zawartość (%at) poszczególnych składników po wygrzaniu badano przy użyciu spektroskopii fotoelektronów XPS.

Część doświadczalna

Przygotowanie próbek

Przygotowano płytki ze stopu kobaltowego Co-Cr-Mo (Remanium 2000) o wymiarach 8x10x0.5 mm. Przed nałożeniem powłoki metodą zol-żel, płytki czyszczono mechanicznie, odtłuszczano i trawiono.

Powłokę krzemionkowo-tytanową nakładano z zolu krzemionkowo-tytanowego przygotowanego z czteroetoksyilanu (TEOS) i z propoksylowej pochodnej tytanu $Ti(OC_3H_7)_4$. Stężenie SiO_2+TiO_2 w zolu krzemionkowo-tytanowym wynosiło 7% wagowych. Nakładanie powłoki odbywało się przez wynurzanie płytki ze stopu kobaltowego z roztworu zolu ze stałą szybkością 20cm/min. Następnie płytki suszono i wygrzewano w celu usunięcia wilgoci i zagęszczenia powłoki.

Chemiczny skład powierzchni badano metodą XPS. Widma rejestrowano na spektrometrze fotoelektronów VG Scientific ESCA-3 a do pobudzenia widm użyto linii $AlK\alpha_{1,2}$ (1486.6 eV). Widma kalibrowano względem linii C1s 284.8 eV z powierzchniowego depozytu węgla. Względna zawartość poszczególnych składników powłoki (%at) wyznaczono z całkowania pola pasma. W obliczeniach zawartości form atomowych zastosowano współczynniki czułości [4].

Line	Binding energy [eV]	FWHM	Content [at%]	B.E**, [eV]
Ti 2p*	459.4	3.2	0.039	
Si 2p*	103.6	3.7	0.160	
Co 2p	781.3	4.2	0.072	778.3
Cr 2p	576.2	2.45	0.101	574.4
Mo 3d	232.4	2.5	0.006	228.0
O 1s	530.2	1.95	0.222	
	531.6	2.0	0.116	
	533.3	3.3	0.284	
			0.622	
Al2p	not detected		?	
W4f	not detected		?	
*elements constituting the Si-Ti deposit;				
**binding energies in metals (alloys)				

TABELA 1. Skład powierzchni XPS próbki stopu Remanium 2000 z powłoką Si-Ti.

TABLE 1. XPS surface composition of the Ti-Si coated Remanium 2000 alloy.

Wyniki i dyskusja

Płytki ze stopu kobaltowego pokryte krzemionkowo-tytanową warstwą wygrzano przez 0.5 godziny w 850°C w atmosferze argonu a następnie badano metodą XPS. Skład powierzchni próbki przedstawiono w TABELI 1.

Jak wynika z TABELI 1, próbka po jej sporządzeniu na powierzchni jest całkowicie pokryta przez tlenkowy depozyt Si-Ti i produkty utlenienia stopu powstałe podczas obróbki termicznej. Zostały zarejestrowane wszystkie główne składniki stopu kobaltowego (za wyjątkiem wolframu) jak również składniki powłoki. Wolfram posiada wysoką czułość spektralną i można wnioskować, że jeśli nie został wykryty to albo pozostał w obszarze tuż przy powierzchni metalu albo rozpuścił się w zewnętrznej warstwie tlenkowej.

Experimental procedure

Sample preparation

Metal plates 8 x 10 x 0.5 mm, were prepared from cobalt alloy Remanium 2000. Prior to the sol-gel coating samples were mechanically polished, degreased and etched. Silica-titania coating was deposited from silica-titania sol prepared from tetraethoxysilane (TEOS) and from titanium propoxide $Ti(OC_3H_7)_4$. Final concentration of SiO_2+TiO_2 in the silica-titania sol was 7 wt.%. The deposition consisted from withdrawing cobalt alloy plates from silica-titania sol solution at constant speed 20 cm/min. Then, the samples were dried and annealed to remove moisture and to densify the coating.

The surface composition was controlled by XPS. The spectra were obtained by a VG Scientific ESCA - 3 photoelectron spectrometer with Al anode x-ray source (1486.6 eV). Binding energies (BE) were referenced to the C 1s peak from the carbon surface deposit at 284.8 eV. A relative element content was obtained from the integrated XPS peak areas. For the calculation the sensitivity factors [4] were used.

Results and discussion

Remanium 2000 alloy coated with the silica-titania thin nano-layer was heated at 850°C in argon atmosphere and then studied by XPS. Surface analysis of the sample is in TABLE 1.

As it follows from the TAB.1, the surface of the coated alloy after the preparation was fully covered by products of the alloy oxidation and the Si-Ti oxide deposit. All main elements forming the alloy or the coat were detected with exception of tungsten. It has high spectral sensitivity, therefore when tungsten was not detected, it had to be stopped at the meta-scale interface or dissolved in the oxide overlayer.

The alloy sample was cold cleaned being not thermally pretreated before the coating, therefore composition of its surface and bulk should be approximately the same. Assuming this state as initial, significant changes at the surface appeared during the heating at elevated temperatures. As the XPS study shows, the alloy was oxidized and the surface enriched with chromium (TAB.2). The binding energies of the alloy elements (column 2) were measured much higher than that in their metal state (TAB.1, column 4) and they were typical for oxidation numbers in corresponding stable oxides: Mo^{+6} , Co^{2+} and Cr^{+3} in anhydrous oxides. Since fresh silica or titania gels are chemically active, their reaction with alloy related metal oxides could be expected [5,6]. Absence of tungsten in the outer surface layer and its strong enrichment with chromium (TAB.2) support this hypothesis. Also high width (FWHM) of Si2p and Ti2p bands points at low ordering in neighbourhood of these atoms, like it is expected for nano-dispersed, low-ordered compounds.

	Co	Cr	Mo	W	Si
Bulk	0.610	0.250	0.070	0.050	0.015
Surface	0.404	0.564	0.032	-	-*

* Alloy-origin Si2p signal was overcome by that much stronger from the deposited layer. For its low content at about 1 at% its contribution has been neglected.

TABELA 2. Względna zawartość składników stopu (% at.).

TABLE 2. Alloy elements relative content, at%.

Powierzchnia płytki przed nanoszeniem powłoki była czyszczona na zimno i nie była grzana, stąd skład powierzchni i wnętrza stopu winny być w przybliżeniu takie same. Przyjmując taki stan za początkowy, można stwierdzić, że po wygrzaniu w wyższej temperaturze występują znaczne zmiany w obszarze powierzchni. Jak pokazują badania XPS, stop ulega utlenieniu a powierzchnia wzbogaca się w chrom (TABELA 2). Zmierzone energie wiązania składników stopu po wygrzaniu (kolumna 2) posiadają znacznie wyższe wartości niż energie zmierzone dla wyjściowej próbki (TAB.1, kolumna 4) i są one typowe dla stopni utlenienia w odpowiednich trwałych tlenkach: Mo^{6+} , Co^{2+} i Cr^{3+} .

Ponieważ świeże żele krzemionkowe lub tytanowe są chemicznie bardzo aktywne, można oczekiwać ich reakcji z tlenkową powierzchnią stopu [5,6]. Nieobecność wolframu w zewnętrznej warstwie powierzchniowej i jej silne wzbogacenie w chrom (TAB.2) potwierdza tę hipotezę. Również duża szerokość połówkowa (FWHM) pasm $\text{Si}2p$ i $\text{Ti}2p$ pozwala wnioskować o niskim uporządkowaniu otoczenia tych atomów, tak jak to występuje w nano-materiałach niskokrystalicznych.

Porównanie względnych zawartości składników stopowych w stopie i na powierzchni (TAB. 2) wskazują na duże wzbogacenie powierzchni w chrom, ponad dwukrotne i około półtora krotne zubożenie w kobalt. Stosunek Co/Cr z 2.44 maleje do 0.72. Również stosunek Si/Ti przy powierzchni (4.0) różni się od tegoż w zolu (5.0).

Pasmo $\text{O} 1s$ jest nieregularne, szerokie i zostało rozłożone na trzy pasma: przy 530.2, 531.6 i 533.3 eV. Można je przypisać odpowiednio, prostym tlenkom: kobaltu (530.1 eV) i molibdenu (530.4 eV), chromu (531.5 eV) oraz krzemu (533 eV). Jednakże zmierzone intensywności pasm tlenowych nie odpowiadają udziałom odpowiednich metali. Ta obserwacja wymaga zaproponowania innej, bardziej złożonej struktury pasma tlenowego $\text{O}1s$, uwzględniającej większą liczbę pasm składowych. Jednakże piki, których maksima będą usytuowane przy innych wartościach energii wiązania BE niż energie wiązania dla prostych tlenków, można jedynie przypisać bądź tlenkom mieszanym bądź fazom wieloskładnikowym.

Chociaż metoda XPS nie jest w pełni przydatna do rozwiązywania problemów strukturalnych, to jednak w tym przypadku dostarcza ona mocnych argumentów za tworzenia się w wyniku wygrzewania związków chemicznych pomiędzy metalem podłoża a ceramiczną warstwą Si-Ti .

Można więc stwierdzić, że w procesie wygrzewania (850°C) zol krzemionkowo-tytanowy reaguje z warstwą powierzchniową tlenków tworzących się w tym czasie na powierzchni stopu kobaltowego.

Podziękowania

Autorzy dziękują Komitetowi Badań Naukowych za finansowanie projektu No 4T08A 04523

Relations between alloy elements in the bulk and on the surface (TAB.2), reveal strong enrichment in chromium, by more than twice (2.26) and depletion by 1.5 in cobalt during the processing. The Co/Cr ratio from 2.44 decreased to 0.72. Also the Si/Ti ratio at the surface (4.0) differ from that in the initial sol (5.0).

The $\text{O}1s$ band appeared irregular and wide. It was well fitted with three peaks at 530.2, 531.6 and 533.3 eV. They can be attributed to simple cobalt (530.1 eV) with molybdenum (530.4 eV), chromium (531.5 eV) and silicon (533 eV) oxides respectively. However their measured intensities do not follow the corresponding metal contributions. This observation points to another, more complex structure of the $\text{O}1s$ band, consisted of more contributory peaks. But peaks located at other B.E-s than that in simple oxides have to be originated in a mixed oxide compounds or many component phases.

Though the XPS method is not fully adequate to solve the structural problems, however in this case it supplies strong arguments for a compound formation.

Concluding, it can be assumed, that the silica-titania sol reacts with metal oxides produced at the alloy surface during its high temperature exposition

Acknowledgements

The financial support by Scientific Research Committee of Poland (KBN) project No 4T08A 04523 is gratefully acknowledged.

References

- [1] Kohn DH, Ducheyne P., "Medical and Dental Materials", Edited by Williams DF. Verlagsgesellschaft, FRG, VCH; 1996.
- [2] Livage J. Sanchez C., J. Non-Cryst. Solids 145 (1992) 11-19.
- [3] Stoch A., Lejda W., Rakowska A., Metallurgy and Foundry Engineering 18, No2 (1992) 233-239.
- [4] D.Briggs, M.P.Seah, Practical Surface Analysis 2nd ed. Vol. 1, John Wiley 1990, p. 635.
- [5] Stoch A., Stoch J., Rakowska A., Surf. Interface Anal. 22 (1994) 242-247.
- [6] Stoch A., Stoch J., Surf. Interface Anal. 19 (1992) 487-492.

WŁÓKNA WĘGLOWE MODYFIKOWANE HYDROKSYAPATYTEM

I. PIEKARCZYK-RAJZER, M. BŁĄŻEWICZ,

AGH, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, KRAKÓW

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),63-65]

Wprowadzenie

Włókniste materiały węglowe stanowią obiecujący materiał do regeneracji ubytków tkanek [1-6]. Implanty te są materiałami biogodnymi, jednak nie posiadają aktywności biologicznej prowadzącej do stymulującego działania na komórki kostne. W kontakcie z tkanką kostną, pokrywają się otoczką z tkanki łącznej, która po pewnym okresie od wszczepienia ulega mineralizacji. Sprawia to, że proces odbudowy kości w obecności włókien węglowych przebiega długo, co w znacznym stopniu ogranicza stosowanie tego implantu do leczenia ubytków tkanki kostnej [1]. W celu poprawy własności biologicznych włókna węglowe poddawać można różnym modyfikacją chemiczną i strukturalną. Oprócz pokrywania włókien powłokami lub warstwami możliwa jest również modyfikacja ich składu chemicznego na poziomie prekursora [7-9].

Celem pracy było otrzymanie bioaktywnych włókien węglowych z prekursora poliakrylonitrylowego (PAN) modyfikowanego hydroksyapatytem. Włókna poddano badaniom in vitro w płynach ustrojowych (SBF) i wykazano że na ich powierzchni krystalizuje fosforan wapnia.

Materiały i metody

Prekursorem włókien węglowych były włókna poliakrylonitrylowe, opracowane przez KWS WłiMT Politechniki Łódzkiej. Włókna modyfikowano na poziomie prekursora nano-hydroksyapatytem wytworzonym w KCS, AGH Kraków [10]. Stabilizację prekursora zawierającego cząstki hydroksyapatytu prowadzono wieloetapowo w zakresie temperatur 150-280°C w atmosferze utleniającej. Następnie włókna karbonizowano w temperaturze 1000°C przez 15 min (50°C/min). Mikrostrukturę włókien węglowych i skład chemiczny scharakteryzowano przy użyciu mikroskopu skaningowego Jeol, JSM-5400 z przystawką EDS do analizy chemicznej w mikroobszarach (Link ISIS seria 300). Test bioaktywności przeprowadzono w sztucznym osoczu (SBF) o pH 7,4 w temperaturze 37°C. Skład jonowy płynu podano w TABELI 1. Włókna polimerowe i węglowe modyfikowane nanocząstkami hydroksyapatytu inkubowano w 50ml płynu SBF w zamkniętych polietylenowych pojemnikach przez 14 dni. Po inku-

JONY [mM]	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0
Naturalne osocze	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0

TABELA 1. Skład płynu SBF i naturalnego osocza.
TABLE 1. Ion concentration of SBF and human blood plasma.

CARBON FIBRES MODIFIED WITH HYDROXYAPATITE

63

I. PIEKARCZYK - RAJZER, M. BŁĄŻEWICZ

AGH-UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE
AND CERAMICS, KRAKÓW, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),63-65]

Introduction

Carbon fibres are promising materials for regeneration of bone tissue defects [1-6]. Such implants are biocompatible, however they lack the biological activity leading to stimulating interaction with bone cells. In direct contact with bone tissue, they become coated with connective tissue, which undergoes mineralization after some time past implantation. This is a reason for long duration of the process of bone restoration, which to a large extent limits the applicability of such implant in treatment of bone tissue defects [1]. In order to improve their biological properties, carbon fibres can be subjected to various chemical and structural modifications. Other than coating their surfaces with films and layers, it is also possible to modify their chemical composition at the precursor level [7-9].

The aim of this work was the preparation of bioactive carbon fibres on the basis of polyacrylonitrile (PAN) modified using hydroxyapatite. Carbon fibres were subjected to in vitro tests in physiological fluids (SBF), and it was shown that calcium phosphate crystallizes on their surfaces.

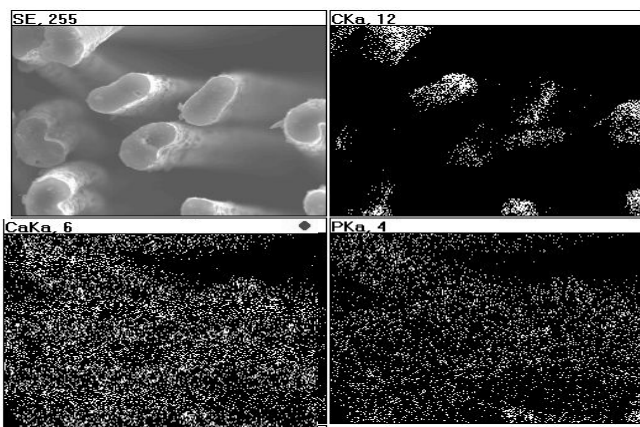
Materials and methods

The polyacrylonitrile fibres developed by KWS, WłiMT of Łódź Polytechnic were the precursor for carbon fibres examined in this study. Fibres were modified at the precursor stage with use of hydroxyapatite made at the KCS, AGH Kraków [10].

The stabilization of precursor containing hydroxyapatite particles was carried out in a multi-stage way in oxidizing atmosphere, within the temperature range of 150-280°C. Fibres were then carbonized at the temperature 1000°C during 15 min (50°C/min). The microstructure of carbon fibres and their chemical composition were characterized with use of scanning electron microscope Jeol, model JSM-5400, with EDS attachment for chemical microanalysis (Link ISIS series 300). The bioactivity tests were performed using artificial plasma (SBF) of pH 7.4, at the temperature of 37°C. Ionic composition of the fluid can be seen in TABLE I. Both polymer and carbon fibres modified with hydroxyapatite nanoparticles were incubated during 14 days in 50 ml of SBF fluid, in closed polyethylene containers. After incubation samples were washed with distilled water and dried in room temperature. The state of material's surface morphology before and after incubation in artificial plasma (SBF) was observed using scanning electron microscopy. Concentrations of calcium and phosphorus ions in SBF fluid were determined using the ICP method.

Results and discussion

Microscopic images presenting the microstructures of carbon fibres modified with hydroxyapatite, together with maps of distribution of such elements as calcium, carbon



RYS. 1. Obraz mikroskopowy (SEM) włókien węglowych, modyfikowanych nanocząstkami hydroksyapatytu. Rozkład pierwiastków Ca, P na powierzchni włókien węglowych.

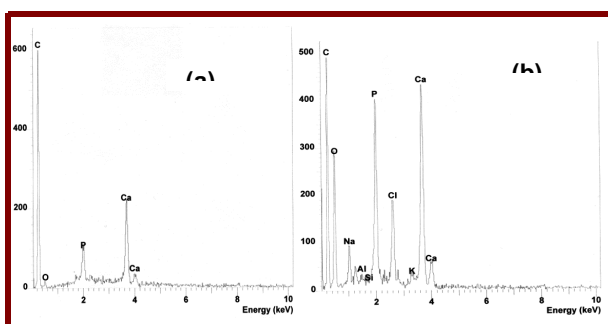
FIG. 1. Microscope image (SEM) of carbon fibers with HAp. Note the presence of Ca, P on the surface of carbon fibers.

bacji próbki płukano wodą destylowaną i suszono w temperaturze pokojowej. Wykorzystując skaningową mikroskopię elektronową oceniono stan powierzchni materiału przed i po inkubacji w sztucznym osoczu (SBF). Stężenie jonów wapnia i fosforu w płynie SBF, po usunięciu próbek oznaczono metodą ICP.

Wyniki badań i dyskusja

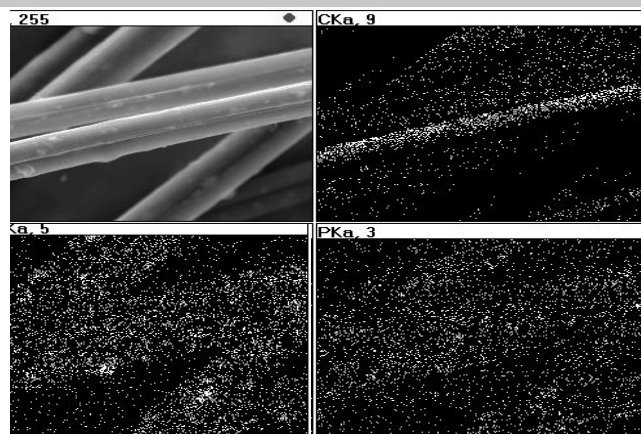
Obrazy mikroskopowe przedstawiające mikrostrukturę włókien węglowych, modyfikowanych hydroksyapatytem połączone z mapami rozkładu pierwiastków takich jak węgiel, wapń i fosfor przedstawiono na RYS.1. Zarówno na powierzchni jak i we wnętrzu włókien obecne są cząsteczki (aglomeraty nanocząstek) fosforanu wapnia. Morfologie powierzchni włókien przed i po 14 dniach inkubacji w płynie SBF przedstawiono na RYS.2. Przed inkubacją w SBF włókna węglowe charakteryzowały się gładką powierzchnią (RYS.2a) i niewielką zawartością wapnia i fosforu (RYS.3a). Podczas inkubacji w sztucznym osoczu zaobserwowano wydzielanie apatytu na powierzchni włókien już po kilku dniach. RYS.2b-d przedstawiają morfologie włókien po 14 dni inkubacji w płynie SBF.

RYS.3 przedstawia zmiany stężenia jonów wapnia i fosforu w płynie SBF, w czasie inkubacji materiałów węglowych. Widoczny jest powolny wzrost stężenia jonów wapnia w obydwu próbkach. W przeciwieństwie do wzrostu stężenia

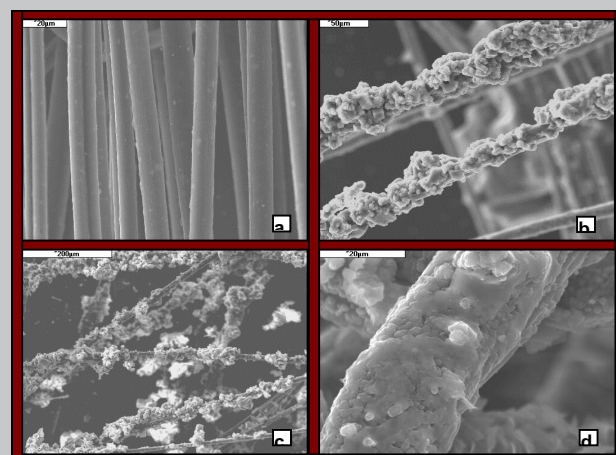


RYS. 3. Wykres EDS powierzchni włókien węglowych modyfikowanych nanohydroksyapatytem przed (a) i po (b) inkubacji w SBF.

FIG. 3. The EDS spectra of fibers surface modified with Hap nanoparticles before (a) and after (b) immersion in SBF.

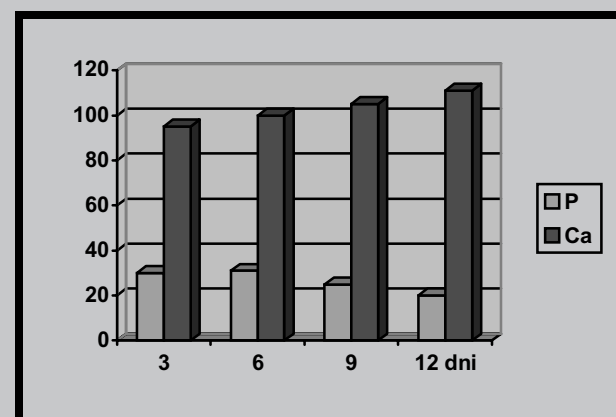


and phosphor, are shown in FIG.1. Particles (nanoparticle agglomerates) of calcium phosphate are present both at fibre surface and its interior. Carbon fibre surface morphologies, before and after 14 days incubation in SBF fluid, are shown in FIG.2. Before incubation in SBF, carbon fibres were characterized by smooth surfaces (Fig.2a) and small Ca and P contents (FIG3.a). During incubation in artificial plasma, apatite secretions on fibre surfaces were already observed after a few days. FIGs.2b-d show fibres



RYS. 2. Obraz mikroskopowy (SEM) włókien węglowych modyfikowanych nanocząstkami hydroksyapatytu przed (a) i po inkubacji (b, c, d) w SBF.

FIG. 2. Microscope image (SEM) of carbon fibers with HAp nanoparticles before (a) and after (b, c, d) immersion in SBF.



RYS. 4. Zależność stężenia jonów wapnia i fosforu w SBF, od czasu inkubacji włókien węglowych.

FIG. 4. Changes of Ca and P concentrations (mg/l) of the SBF solution after soaking the carbon fibers for various period.

jonów Ca, stężenie jonów P ulega stopniowemu zmniejszaniu przez cały okres trwania inkubacji.

Wnioski

Przeprowadzone badania wykazują, że modyfikacja składu fazowego włókien węglowych, na poziomie organicznego prekursora, stanowić może przydatną metodę prowadzącą do nadawania włóknom węglowym właściwości bioaktywnych.

Podziękowania

Badania finansowane przez Ministra Nauki Informatyzacji w ramach grantu KBN nr; 3T08D 01927.

Piśmiennictwo

- [1] S. Błażewicz, I. Piekarczyk, E. Staszko, T. Mikołajczyk Chemically and physically functionalized carbon composites - a prospective material for tissue treatment, Carbon 2004, Providence, Rhode Island, USA, 11-16 July, 2004.
- [2] M. Błażewicz, Carbon Materials in the treatment of soft and hard tissue injuries European Cells and Materials Vol.2. 2001, 21-29.
- [3] I. Piekarczyk, E. Menaszek, L. Zamorska Porowate włókna węglowe dla celów medycznych Inżynieria Biomateriałów, nr 30-33 (2003) str. 78-82.
- [4] U.K. Debnath, J.A. Fairclough, R.L. Williams Long-term local effects of carbon fibre in the knee The Knee 11 (2004) 259-264.
- [5] E. Pamuła, B. Konieczna, M. Błażewicz Badania nad opracowaniem biomateriału kompozytowego do rekonstrukcji krtani Polimery w medycynie 2001, T. XXXI, Nr 1-2.
- [6] M. Błażewicz Implanty węglowe wytworzone z włókien poliakrylonitrylowych w leczeniu tkanek miękkich Polimery w medycynie 2001, T. XXXI, Nr 1-2.

ZAKŁÓCENIA OBRAZU W BADANIACH TOMOGRAFII KOMPUTEROWEJ (TK) I TOMOGRAFII REZONANSU MAGNETYCZNEGO (MR)

JAN ŚWIĄTKOWSKI*, EWA JARKIEWICZ-KOCHMAN*,
EWA PACHOLEC*, GRZEGORZ BENKE*, MAREK GOŁĘBOWSKI*,
STANISŁAW BŁAŻEWICZ**, ARTUR WOJCIECHOWSKI*,
JERZY GOŹDZIK*

*AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE
I ZAKŁAD RADIOLOGII KLINICZNEJ,
KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII NARZĄDU RUCHU
**KATEDRA BIOMATERIAŁÓW AGH W KRAKOWIE

Streszczenie

W miarę rozwoju technik operacyjnych, w obrazowaniu diagnostycznym spotykamy coraz częściej wprowadzone biomateriały zbudowane z metalu lub produktów kompozytowych. Są to protezy naczyniowe, stenty, spirale odszczepialne, klipsy naczyniowe, szwy metalowe, protezy stawów, materiały służące

morphologies after 14 days incubation in SBF liquid. FIG.4. shows the variations of calcium and phosphor ions concentrations in SBF liquid during carbon materials incubation. Slow increase of calcium concentration in both samples can be observed. Opposite to Ca ion, the P ion concentration decreases gradually during the entire period of incubation.

Conclusions

Performed experiments indicate that modification of carbon fibre phase composition at the precursor stage may become a useful method leading to attribution of bioactive properties to carbon fibres.

Acknowledgements

This study was financial supported by the Minister of Science and Information Society Technologies (project No: 3T08D 01927).

References

- [7] I. Piekarczyk, E. Menaszek Bioactive Carbon Fibers, 1st Student's Scientific Conference of Biomechanics BIO-MECH-YOUNG, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Seria: Konferencje, nr 4 (2004) str. 77-78
- [8] T. Mikołajczyk, M. Boguń, I. Piekarczyk, M. Błażewicz, D. Wołowska-Czapnik Wpływ nanododatku SiO₂ na właściwości prekursorowych włókien PAN i uzyskanych z nich włókien węglowych Inżynieria Biomateriałów, nr 38-42 (2004) str. 224-228
- [9] M. Błażewicz, I. Piekarczyk, E. Menaszek, K. Haberko Polymer and carbon fibers with HAp nanopowder; properties and biocompatibility of degradation products ECM V The Cell Biomaterial Reaction, Davos, Switzerland, June 28 - 30th, 2004.
- [10] K. Haberko, M. Bucko, M. Haberko, W. Mozgawa, A. Pyda, J. Zarębski, Natural Hydroxyapatite-preparation, properties, Engineering of Biomaterials, 2003, 30-33.

IMAGE INTERFERENCE IN THE COMPUTED TOMOGRAPHY AND THE NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE EXAMINATIONS

JAN ŚWIĄTKOWSKI*, EWA JARKIEWICZ-KOCHMAN*,
EWA PACHOLEC*, GRZEGORZ BENKE*, MAREK GOŁĘBOWSKI*,
STANISŁAW BŁAŻEWICZ**, ARTUR WOJCIECHOWSKI*,
JERZY GOŹDZIK*

*MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,
THE 1ST DEPARTMENT OF CLINICAL RADIOLOGY,
DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY OF
LOCOMOTOR SYSTEM

**CHAIR OF BIOMATERIALS UNIVERSITY OF MINING AND
METALLURGY, CRACOW

Abstract

With the widespread use of modern operational techniques in clinical diagnostic imaging we often encounter the problem of metal and composite build biomaterials such as vascular prosthesis, stents, vascular clips, metal sutures, joint prosthesis and materials used in osteosynthesis. All those materials can

do zespołen w ortopedii.

Wszystkie te produkty powodują zakłócenia obrazu, które ograniczają wartość diagnostyczną nowoczesnych badań obrazowych. Dotyczy to przede wszystkim obrazowania MR i TK.

Określenie stopnia zakłócenia obrazu oraz przeciwdziałanie jest tematem badań wielu ośrodków na świecie.

W naszej prezentacji podjęliśmy próbę zdefiniowania artefaktów ograniczających wartość diagnostyczną metod obrazowych oraz możliwości ich zredukowania.

Od końca XIX wieku podstawową metodą obrazowania były dwupłaszczyznowe zdjęcia rentgenowskie rozszerzone o badania kontrastowe. Przeszkody w ocenie wyników tych badań były jedynie skutkiem mniejszego lub większego stopnia pochłaniania promieni rentgenowskich, co utrudniało pełną ocenę. Wprowadzone w latach siedemdziesiątych ubiegłego stulecia nowe techniki diagnostyki obrazowej jak tomografia komputerowa (TK) i tomografia rezonansu magnetycznego (MR) rozszerzyły znacznie możliwości rozpoznania, jednak równocześnie pojawiły się nowe przeszkody w interpretacji uzyskanych obrazów. W Tomografii Komputerowej spotykamy artefakty związane z utwardzeniem wiązki (beam hardening), całkowitym pochłanianiem fotonów (photon starving), artefakty linijne (streak arteacts), zniekształcenia obrazu badanych przedmiotów związane z rekonstrukcją obrazu otrzymywanego w technice spiralnej oraz efekt uśredniania (partial volume effect).

Rezonans Magnetyczny w przeciwieństwie do tomografii komputerowej obarczony jest większą ilością parametrów wpływających na jakość obrazowania. Badane obiekty umieszczane są w silnym stałym polu magnetycznym (15 000 Gy, dla porównania siła przyciągania ziemskiego ma wartość ok. 0,6 Gy) z nałożonym zmiennym polem w trzech kierunkach (X, Y, Z). Obraz jest tworzony przez odpowiedź obiektu na wygenerowaną falę elektromagnetyczną o częstotliwościach radiowych (16-64 kHz). Zakłócenia obrazu wynikają z: niejednorodności pola magnetycznego, zakłóceń zewnętrznych fal wpływających na częstotliwości radiowe i wprowadzonych biomateriałów, oraz biologicznych czynników organizmów (oddech, przepływ krwi, tętnienie naczyń) i składu biochemicznego (woda - tłuszcz) tkanek.

W przypadkach wszczepów metalowych brak informacji o składzie chemicznym stopu może doprowadzić do uszkodzeń tkanek w silnym polu magnetycznym. Z kolei wzrost temperatury tkanek i biowszczepów może być przyczyną reakcji zapalnej.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),65-66]

cause the image interference which reduces the diagnostic value of modern imaging modalities, especially the computed tomography (CT) and the nuclear magnetic resonance (NMR) examinations. Studies on the image interference and the image depletion prevention are conducted in many centers worldwide.

The aim of our presentation was to assess the artifacts that decrease the diagnostic value of different imaging techniques and to evaluate methods of the artifact reduction.

Since the end of the 19th century biplane X-ray images and later introduced contrast enhanced studies became the basic imaging modality in everyday clinical practice.

In case of those classical examinations different X-ray absorption was the main obstacle hampering reliable image assessment. Introduction of CT and NMR in 1970's improved diagnostic possibilities but also brought new problems to images interpretation.

In the CT we often encounter the problems related to the beam hardening and photon starving effects. Streak artifacts and the image distortion due to the partial volume effect are also common. On the contrary to the CT, the NMR requires more parameters which can influence on the image quality. Examined objects are placed in a strong, constant magnetic field (15 000 Gy, by comparison Earth's magnetic field reaches approximately 0,6 Gy) with added field alternating in three dimensions (X, Y, Z). The image is created by objects reply to radiofrequency (16-64 kHz) electromagnetic wave. Image interferences are caused by: magnetic field nonuniformity, interference of external waves influencing on radiofrequency waves, implantation of biomaterials. Image depletion can also be due to biological factors such as respiratory movements, blood flow, arterial pulse and biochemical composition of examined tissues (water-fat). In case of metal implants, lack of information concerning alloy composition can lead to tissue damage in a strong magnetic field. Magnetic field related increase in biological implants temperature can be a cause of inflammatory reaction.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),65-66]

OCENA ENDOPROTEZ STAWU BIODROWEGO W BADANIU TOMOGRAFII KOMPUTEROWEJ (TK)

EWA JARKIEWICZ-KOCHMAN, JAN ŚWIĄTKOWSKI,
MAREK GOŁĘBIEWSKI, EWA PACHOLEC, TOMASZ JABŁOŃSKI,
KAROL PURSKI

AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE
I ZAKŁAD RADIOLOGII KLINICZNEJ,
KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII NARZĄDU RUCHU

Streszczenie

W celu przywrócenia funkcji podporowych i lokomocyjnych w leczeniu schorzeń i uszkodzeń narządu ruchu szeroko stosowane są endoprotezy stawów. Najczęstszym wskazaniem do ich stosowania jest choroba zwyrodnieniowa stawów biodrowych.

Do radiologicznej oceny prawidłowości założenia oraz okresowej kontroli na ogół wystarcza zdjęcie RTG miednicy z oboma stawami biodrowymi w projekcji przednio tylnej (AP) niekiedy rozszerzone o projekcję osiową. Projekcja osiowa jest wynikiem zgięcia w badanym stawie, a promień centralny biegnie równolegle do osi długiej tułowia (w projekcji AP jest on prostopadły). Projekcja osiowa ze względu na konieczność zgięcia w stawie nie zawsze jest możliwa do wykonania a czasami przeciwwskazana. Tego rodzaju badania nie zawsze jednak dają pełną odpowiedź. Chodzi tu przede wszystkim o tzw. aseptyczne i septyczne (niezapalne i zapalne) obłuzowania protezy. W tych przypadkach badaniem z wyboru staje się Tomografia Komputerowa (TK). Interpretacja jej obrazów nie zawsze jest jednoznaczna ze względu na zakłócenia obrazu wywołane metalowymi elementami sztucznego stawu. Są to artefakty związane z utwardzeniem wiązki (beam hardening), całkowitym pochłanianiem fotonów (photon starving), artefakty liniowe (streak artefacts), zniekształcenia obrazu badanych przedmiotów związane z rekonstrukcją obrazu otrzymywanego w technice spiralnej oraz efekt uśredniania (partial volume effect).

Stosowana od 1989 i stale udoskonalana Tomografia Komputerowa spiralna (technika wielorzędowa) umożliwiają znaczne ograniczenie niekorzystnych efektów wywołanych przez elementy metaliczne. W miarę wprowadzania aparatów wielorzędowych (16 i 32, 64 rzędy - dotychczasowym standardem był aparat jednorzędowy) uzyskujemy obrazy wolne od artefaktów metalicznych.

W Klinice i Katedrze Ortopedii AM w Warszawie w przypadkach wątpliwych jako standard stosujemy Tomografię Komputerową Spiralną.

W ostatnich dwóch latach wykonano 500 realloplastyk (wymiana obłuzowanej protezy) w ramach ustalenia wskazań do operacji posłużona się Tomografią komputerową w 15% przypadkach.

Uzyskaliśmy wiarygodne określenie stanu kości otaczających protezę oraz części miękkich, Było to możliwe dzięki umiejętne eliminowaniu zakłóceń. Trzeba pamiętać, że wydłuża to czas oczekiwania na wynik badań ze względu na konieczność odpowiedniej rekonstrukcji obrazu.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),67]

ASSESSMENT OF THE HIP JOINT ENDOPROSTHESIS IN THE COMPUTED TOMOGRAPHY EXAMINATION

...67...

EWA JARKIEWICZ-KOCHMAN, JAN ŚWIĄTKOWSKI,
MAREK GOŁĘBIEWSKI, EWA PACHOLEC, TOMASZ JABŁOŃSKI,
KAROL PURSKI

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,
THE 1ST DEPARTMENT OF CLINICAL RADIOLOGY,
DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY OF LOCOMOTOR SYSTEM

Abstract

Implantable prostheses are widely used in the treatment of the hip joint diseases and injuries. Degenerative joint disease is the most common indication to this kind of treatment.

In radiological postoperational assessment as well as in a routine control examination a plain anteroposterior (AP) X-ray of pelvis and both hips is usually required. In some cases additional axial X-ray is also needed. Axial projection is obtained by bending the hip in the examined joint while the central X-ray beam passes parallel to the patient's trunk (in AP projection X-ray beam is orthogonal to the patient's trunk). Axial projection examination can not be conducted in cases of hip bending impossibility or contraindication to hip movement. Furthermore, in case of patients in whom septic or aseptic (inflammatory or noninflammatory) endoprosthesis displacement is suspected, axial projection examination can sometimes be insufficient for establishing the exact diagnosis. In such cases computed tomography (CT) became golden standard imaging technique and is essential for accurate assessment. However, precise CT scans interpretation can be hampered by the image interference caused by artificial joint metal elements. These artifacts are related to beam hardening, photon starving, streak artifacts, as well as image distortion due to scan reconstruction obtained in the spiral technique and partial volume effect.

Introduced in 1989 spiral CT and later developed multidetector technique allows more accurate assessment. Increase in the number of detectors placed in a row (16, 32, 64 - in stead of one) leads to the constant improvement of the image quality with substantially decreased number of artifacts caused by metal objects.

In the 1st Chair and Department of Orthopedics and Traumatology spiral CT is a method of choice in questionable cases.

In last 2 years in our Department there were 500 reoperations conducted due to endoprosthesis displacement. CT examination was performed in 15% cases.

CT scans and expert artifacts elimination allowed reliable assessment of bones and soft tissues surrounding the prosthesis. However complicated process of image reconstruction in patients with implanted hip joint endoprosthesis makes a routine CT scanning a time consuming procedure

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),67]

68 TRUDNOŚCI W OCENIE BADAŃ TOMOGRAFII KOMPUTEROWEJ (TK) PO ZAŁOŻENIU APARATU ILIZAROWA

EWA PACHOLEC, JAN ŚWIĄTKOWSKI, EWA JARKIEWICZ-KOCHMAN,
SŁAWOMIR ŻAREK, JAROSŁAW MACIAS, MAREK GOŁĘBIOWSKI

IAkademia Medyczna w Warszawie
I ZAKŁAD RADIOLOGII KLINICZNEJ,
KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII NARZĄDU RUCHU

Streszczenie

W leczeniu schorzeń narządu ruchu stosuje się coraz częściej stabilizację zewnętrzną w tym metodę Ilizarowa

Metoda Ilizarowa znalazła szerokie zastosowanie w ortopedii. Stosuje się ją w wydłużeniach kończyn, przy skomplikowanych wrodzonych wadach narządu ruchu, w leczeniu złamań i powikłań zrostu kostnego. Wielokrotnie powtarzane badanie rentgenowskie jest konieczne dla oceny przebiegu leczenia. Istotną przeszkodę w tej obserwacji stanowią metalowe elementy stabilizatora uniemożliwiające dokładny wgląd w strukturę kości. Zewnętrzny stabilizator Ilizarowa składa się z różnej średnicy pierścieni mocowanych do kości za pomocą drutów Kirschnera, a następnie połączonych nagwintowanymi prętami, uzupełnionymi w razie konieczności zawiasami.

W większości przypadków dwupłaszczyznowe zdjęcia RTG wystarczają do oceny przebiegu leczenia. Jednak w wątpliwych przypadkach, zwłaszcza gdy mamy do czynienia z zaburzeniem zrostu złamanej kości musimy posłuszkować się innymi metodami techniki obrazowej.

W Klinice i Katedrze Ortopedii AM badaniem z wyboru w takich przypadkach jest Tomografia Komputerowa (TK). Pozwala ona na dokładniejszą prezentację blizny kostnej jednak na ocenę niekorzystnie wpływają elementy metalowe aparatu, szczególnie pierścienie

W klinice i Katedrze Ortopedii AM w przeciągu ostatnich trzech lat wykonano 42 badań TK celem określenia postępu zrostu kostnego.

Diagnostyczny wynik uzyskano w 35 Przypadkach, w 7 przypadkach był on wątpliwy z uwagi na bardzo liczne artefakty metalowe.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),68]

PATIENTS WITH ILIZAROW APPARATUS - PROBLEMS IN THE COMPUTED TOMOGRAPHY IMAGES INTERPRETATION

EWA PACHOLEC, JAN ŚWIĄTKOWSKI, EWA JARKIEWICZ-KOCHMAN,
SŁAWOMIR ŻAREK, JAROSŁAW MACIAS, MAREK GOŁĘBIOWSKI

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,
THE 1ST DEPARTMENT OF CLINICAL RADIOLOGY,
DEPARTMENT OF ORTHOPAEDICS AND TRAUMATOLOGY OF LOCOMOTOR SYSTEM

Abstract

External stabilization with Ilizarow apparatus is a widely used method in modern orthopedics. It is indicated in limbs elongation, treatment of complicated congenital limbs malformation as well as in the management of fractures and synostosis complications. Multiple X-ray examinations are essential for proper monitoring of the treatment. However metal build elements of the device make the appropriate assessment of bone structure very difficult.

External stabilizer consists of steel rings of different diameter fastened to the bone by Kirschner's wires and connected to each other by iron rods and hinges. In most cases biplane X-ray examination is sufficient for the monitoring of the treatment. In questionable cases e.g. in patients presenting with disturbances in the union of the fractured bone additional imaging modalities are required for the correct evaluation.

In the Department of Orthopaedics and Traumatology computed tomography (CT) is a method of choice in such cases. CT imaging allows accurate assessment of the bone scar, however the exact evaluation is substantially hampered by steel elements especially the rings of the Ilizarow apparatus.

In last three years in our Department we conducted 42 CT scans to evaluate the union of the fractured bones.

Images of good quality, allowing the proper diagnosis were obtained in 35 cases.

In 7 cases the result was questionable due to extensive artifacts.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),68]

SEGMENTOWY GWÓŹDŹ ŚRÓDSZPIKOWY - KONCEPCJA ROZWIĄZANIA

ROMUALD BĘDZIŃSKI, LUDOMIR J.JANKOWSKI

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA
INSTYTUT KONSTRUKCJI I EKSPLOATACJI MASZYN
UL. ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),69-71]

Wstęp

W leczeniu złamań kości długich stosuje się różne metody nastawiania i unieruchamiania odłamów, przede wszystkim w zależności od typu złamania i jego lokalizacji. Znane są trzy grupy takich metod. Do pierwszej należy zaliczyć techniki oparte na ręcznym nastawieniu odłamów i ich unieruchomieniu opatrunkiem gipsowym. Drugą grupę stanowią metody oparte na stosowaniu zewnętrznych urządzeń stabilizujących odłamy złamanej kości, w tym umożliwiające dynamizację stabilizacji, co wpływa korzystnie na zrost kości. Do trzeciej grupy należy zaliczyć metody polegające na stabilizacji odłamów za pomocą płytek i gwoździ śródszpikowych wchodzących w bezpośredni kontakt z kością. Szczególnie korzystne, ze względu na mniejsze obciążenie organizmu pacjenta, jest stosowanie osteosyn-tezy kości długich metodą zamkniętą. Polega ona na wprowadzeniu (pod kontrolą rtg) do jamy szpikowej gwoźdźcia śródszpikowego, bez otwierania powłok skórnych w rejonie złamania lub z niewielkim dojściem do miejsca złamania (złamania z fragmentacją kości). Zamknięta osteosyn-teza śródszpikowa, stosowana przede wszystkim w leczeniu złamań zamkniętych i otwartych I stopnia, wykazuje wiele zalet, a wśród nich: prostą technikę operacyjną, małe obciążenie operacyjne pacjenta (w tym krótki czas operacji), niskie ryzyko infekcji, dobrą stabilizację odłamów umożliwiającą leczenie pacjentów bez opatrunku gipsowego, możliwość stymulowania zrostu poprzez docisk odłamów.

Opis proponowanego rozwiązania

Analiza istniejących rozwiązań gwoździ śródszpikowych do leczenia złamań kości długich, w szczególności kości udowej (m.in. opisy patentów PL173443, PL174195, US2002165544, US161369, US6575973) wykazała, że:

1. konieczne jest ryglowanie osadzanego w kanale szpikowym gwoźdźcia za pomocą wkrętów kostnych, a w przypadku ich wyeliminowania - stosowanie rozwiązań często o wysokim stopniu złożoności technicznej, co ma wpływ m.in. na wydłużenie czasu zabiegu osadzania,
2. proponowane rozwiązania gwoździ nie ryglowanych z reguły wymagają ścisłej kontroli poszczególnych etapów osadzania, często nie gwarantując odpowiedniej stabilizacji osiowej i rotacyjnej odłamów (np. stabilizacja tylko na dwóch poziomach)
3. większość rozwiązań cechują wysokie wymagania materiałowe i technologiczne.

Przystępując do opracowania alternatywnej konstrukcji gwoźdźcia śródszpikowego przyjęto, że:

- stabilizacja osiowa i rotacyjna odłamów powinna występować na kilku poziomach, w zależności od położenia i postaci złamania
- gwoździec powinien umożliwiać osadzanie metodą zamkniętą zstępującą, tzn. od strony nasady bliższej kości udowej, bez

SECTIONAL INTRAMEDULLARY NAIL - CONSTRUCTION IDEA

...69...

ROMUALD BĘDZIŃSKI, LUDOMIR J.JANKOWSKI

WROCŁAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY
INSTITUTE OF MACHINE DESIGN AND OPERATION
ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),69-71]

Introduction

Different methods of positioning and stabilisation of broken long bones are applied. There are 3 groups of these methods. Techniques based on manual positioning and a traditional cast constitute the first (oldest) group. Techniques based on the application of the outer stabilising devices, including those which provide dynamic stabilisation for a better process of knitting, belong to second group. The third group consists of techniques which provide stabilisation of the fractured bone's parts using plates or intramedullary nails which are in direct contact with the bone. Particularly, so called, closed osteosynthesis of the long bones is beneficial because the patient's effort is lower. This osteosynthesis depends on the application (with X-ray control) of an intramedullary nail into marrow cavity without cutting the patient's skin in the fracture region or with short cutting in this region (fracture with bone fragmentation). This technique has many advantages, i.e.: simple operation procedure, low operational effort for the patient (short time of operation), low risk of infection, good stabilisation of the bone's fragments without cast, possibility of the knitting process stimulation.

Proposed nails construction

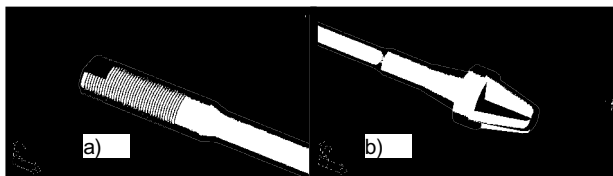
Analysis of the existing intramedullary nail constructions applied in the fractured long bones healing, particularly for femur (for example patent specifications: PL173443, PL174195, US2002165544, US161369, US6575973) shows that:

1. intramedullary nail must be bolted using bone's screws, or for unbolted nail's construction - more complicated solutions must be applied and the operation is time is often longer,
2. proposed unbolted constructions of the intramedullary nails, usually require exact control of the fixation phases, in many cases without proper axial and rotational stabilisation of the bone's fragments (for example, stabilisation on two levels only),
3. high level of the material and technology requirements must be often applied.

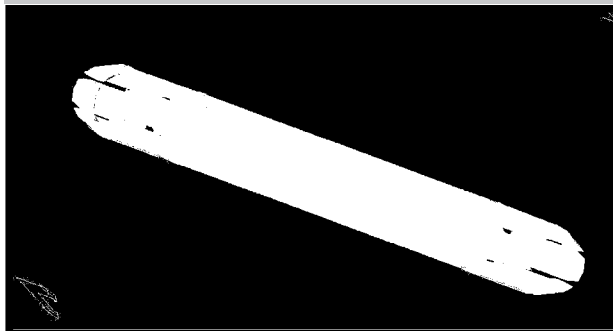
For beginning of the alternative intramedullary nail construction we assume that:

- axial and rotational stabilisation of the bone's fragments must be realised on few levels, depending on the localisation and form of the fracture,
- descending closed technique of fixation (from the trochanter side), without skin cutting for nail stabilisation is preferred.

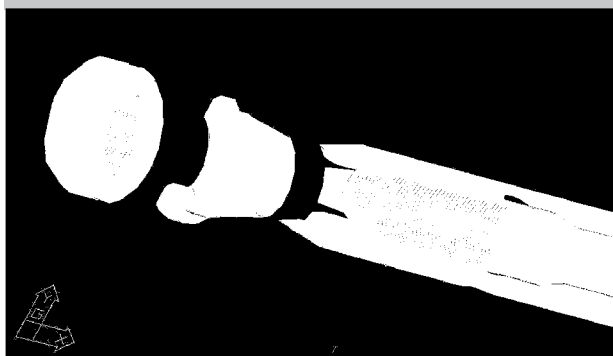
As a result of the research, the construction conception was prepared, based on sectional nail composition. Stabilisation is realised by radially expanded ends of the sleeves fixed on the axle as the "core" of the nail's construction. Adequately shaped axle (FIG.1a and 1b) and sleeves ends (FIG.2) prevent rotation of the bone's fragments, and clamo



RYS. 1. Końcówki trzpienia: a) proksymalna, b) dystalna.
FIG. 1. Proximal (a) and distal (b) ends of the axle.



RYS. 2. Tulejka proksymalna.
FIG. 2. Proximal sleeve.



RYS. 3. Nakrętka ze stożkiem zamykającym.
FIG. 3. Nut with cone for compression.

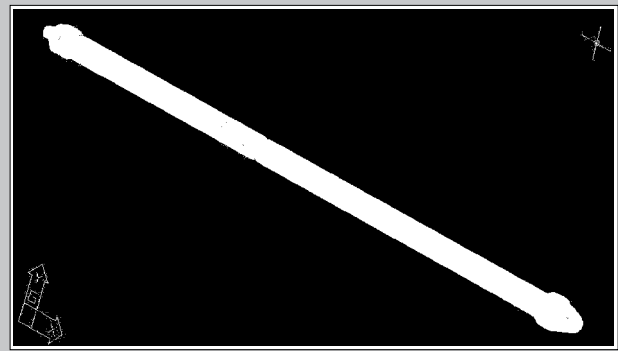
konieczności naruszania powłok skórnych w celu stabilizacji gwoźdźa.

W wyniku prowadzonych prac powstała koncepcja konstrukcji gwoźdźa składającego się z kilku segmentów, w którym stabilizację odłamów zapewniają rozprężane promieniowo podatne elementy tulejek, osadzanych na trzpieniu stanowiącym "rdzeń" konstrukcji. Odpowiednie ukształtowanie trzpienia (RYS.1a i 1b) i końcówek tulejek (RYS.2) zapobiega rotacji odłamów, a stopień zacisku w kanale śródszpikowym wynika ze sprężania całego układu nakrętką nakręcaną na końcówkę trzpienia (RYS.3).

W zależności od położenia złamania, poprzez dobór ilości i długości tulejek, zapewniono dobór liczby poziomów stabilizacji odłamów. Ponadto, ze względu na osobnicze różnice w budowie kanału szpikowego, przewiduje się trzy warianty średnic nominalnych tulejek. W ramach prowadzonych prac opracowano również konstrukcję instrumentarium niezbędnego do osadzenia i usunięcia gwoźdźa.

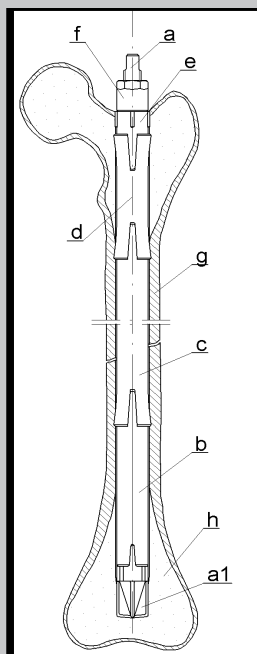
Widok gwoźdźa przygotowanego do rozprężania pokazano na RYS.4, natomiast na RYS.5 przedstawiono poglądowo gwoźdź osadzony w kości udowej z krótkoskośnym złamaniem trzonu kości.

Proponowane rozwiązanie wymaga weryfikacji na prototypie (aktualnie wykonywanym przez BHH Mikromed) obejmującej zagadnienia wytrzymałościowe, materiałowe oraz związane z procedurami osadzania i usuwania gwoźdźa po zakończeniu leczenia.



RYS. 4. Widok gwoźdźa w stanie przygotowanym do rozprężania (układ z trzema poziomami stabilizacji).
FIG. 4. Nail assembly prepared for the compression (three levels stabilisation set).

RYS. 4. Widok gwoźdźa w stanie przygotowanym do rozprężania (układ z trzema poziomami stabilizacji).
FIG. 4. Nail assembly prepared for the compression (three levels stabilisation set).



RYS. 5. Gwoźdź wg proponowanego rozwiązania, po osadzeniu w kości udowej: a, a1 - trzpień, b - tulejka dystalna, c - tulejka pośrednia, d - tulejka proksymalna, e - stożek, f - nakrętka, g - kość udowa.
FIG. 5. Proposed nail construction after fixation in the femur: a, a1 - axle, b - distal sleeve, c - intermediate sleeve, d - proximal sleeve, e - cone, f - nut, g - femur.

force in the marrow cavity is the effect of the nail's set compression using nut winded on the axle end (FIG.3).

Depending on the localisation of the fracture, using proper number and length of the sleeves, a suitable number of the stabilisation levels can be achieved. Because of individual differences in the marrow cavity dimensions, three version of the nominal sleeve's diameters will be made. A construction of the special devices for nail applying and removing was also prepared.

View of the proposed nail set prepared for compression is shown on FIG.4, and a nail fixed in the femur with core fracture is presented of FIG.5.

Proposed idea of the sectional intramedullary nail must be verified on the prototype (presently made by BHH Mikromed) including strength, material, fixation and removing procedures' examination.

Piśmiennictwo

References

- [1] Patent specification proposed in RP Patent Office number P 364 450 (authors: Bedzinski R., Jankowski L., Marciniak J., Gazdzik T., Cieplak J., Chrzanowski W.; submit by Silesian University of Technology).

MIKROSTRUKTURA ORAZ NAPRĘŻENIA WŁASNE ODLEWANYCH STOMATOLOGICZ- NYCH STOPÓW Ni-Cr

ADAM BRZEZIAK, STANISŁAW J. SKRZYPEK, JANUSZ JURASZEK

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA
WYDZ. METALURGII I INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań biologicznych materiałów wykorzystywanych w protetyce dentystycznej. Badania wykonano na stopach Ni-Cr o nazwach handlowych Viron, Remanium, Rodent. Badane próbki były odlewane prostokątnymi o wymiarach 10x20x1 mm.

Przeprowadzono identyfikację składników mikrostruktury na zglądach metalograficznych, natomiast na powierzchni bocznej próbek wykonano analizę fazową oraz zmierzono powierzchniowy stan naprężeń własnych. W tym celu zastosowano mikroskopię świetlną, dyfrakcyjną analizę fazową i dyfrakcyjną metodę $\sin^2\psi$. Wykonano badania metalograficzne materiału.

Ocena stanu naprężenia warstwy powierzchniowej, jak i analiza mikrostruktury stomatologicznych stopów Ni-Cr, wykorzystane będą do doboru parametrów odlewania i do prognozowania właściwości złącza metal - powłoka ceramiczna.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),71]

ZAWIERAJĄCE NANODODATEK MONTMORYLONITU PREKURSOROWE WŁÓKNA PAN DO ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH

MACIEJ BOGUŃ, TERESA MIKOŁAJCZYK

KATEDRA WŁÓKIEN SZTUCZNYCH
WYDZIAŁ INŻYNIERII I MARKETINGU TEKSTYLÓW
POLITECHNIKA ŁÓDZKA
E-MAIL: MACIEK.BOGUN@WP.PL

Streszczenie

Opracowano warunki wytwarzania prekursorowych włókien PAN zawierających nanododatek montmorylonitu. Charakteryzują się one dobrymi własnościami sorpcyjnymi i wytrzymałością na poziomie 24 cN/tex. Włókna te po procesie karbonizacji przeznaczone będą na implanty wspierające i pobudzające proces odbudowy kości.

Słowa kluczowe: nanododatek, włókna prekursorowe, montmorylonit

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),71-74]

Wstęp

Rozwój ortopedii i chirurgii urazowej stawia przed naukowcami zajmującymi się biomateriałami coraz to więk-

MICROSTRUCTURE AND SURFACE RESIDUAL STRESSES IN CASTED Ni-Cr DENTAL ALLOYS

ADAM BRZEZIAK, STANISŁAW J. SKRZYPEK, JANUSZ JURASZEK

AGH-UST, UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
FACULTY OF METALLURGY AND MATERIALS SCIENCE

Abstract

The results of study on biocompatible Ni-Cr high alloy materials applied in prosthodontics are presented. Investigations were carried out executed on Ni-Cr alloys commercially named Viron, Remanium, Rodent. The investigated samples were as cast in shape of rectangular with dimensions of 10x20x1 millimeters.

The metallographic investigations on cross section, phase analysis and residual stresses were measured on beek side of the specimens. These investigations were carried out by means of optical microscope equipped with digital camera, x-ray diffractions phase analysis and x-ray diffraction $\sin^2\psi$ method.

Estimation of state of residual stress of superficial layer, and analysis of microstructure of dental Ni-Cr alloys, will be used in fitting of casting parameters and in modeling of properties of metal - ceramics joints.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),71]

NANOMONTMORILLONITE- CONTAINING PRECURSOR PAN FIBERS FOR MEDICAL APPLICATION

MACIEJ BOGUŃ, TERESA MIKOŁAJCZYK

DEPARTMENT OF MAN-MADE FIBRES
FACULTY OF TEXTILE ENGINEERING AND MARKETING
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ
E-MAIL: MACIEK.BOGUN@WP.PL

Abstract

Conditions for the manufacture of precursor PAN fibers containing a nanoadditive of montmorillonite. The fibers are characterized by good moisture absorption and a tenacity of 24 cN/tex. After being carbonized, they will be designed for implants that support and activate the process of bone reconstruction.

Key words: nanoadditive, precursor fibers, montmorillonite

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),71-74]

Introduction

The development of orthopedics and restorative surgery has imposed growing requirements concerning implant materials on researchers dealing with biomaterials. In addi-

71
.....

sze wymagania w zakresie wytwarzania materiałów implantacyjnych. Oprócz powszechnie stosowanych w inżynierii biomateriałowej stopów tytanu, coraz większe znaczenie zyskują materiały polimerowe np. kwas poliglikolowy [1], polilaktyd [2,3], nanokompozyty węglowe [4-6]. Obecnie jednym z najbardziej rozpowszechnionych materiałów tej grupy są kompozyty węglowe, stosowane m.in. w rekonstrukcjach stawu kolanowego [7,8], i ścięgien Achillesa [9]. Materiały implantacyjne z włókien węglowych oprócz spełnienia przez nie odpowiednich właściwości biologicznych, powinny wykazywać wysoką wytrzymałość przy jednocześnie podwyższonej porowatości. Zarówno wytrzymałość jak i porowatość włókien węglowych uzależniona jest bezpośrednio od struktury włókien prekursorowych wytworzonej podczas ich zestalania i rozciągania. [10-12]

Wprowadzenie do włókien prekursorowych PAN montmorylonitu (MMT) stwarza możliwość otrzymania włókien węglowych charakteryzujących się nowymi dotąd nie spotykanymi właściwościami. Biokompozyt wytworzony z włókien węglowych zawierających MMT posiadać będzie w swojej budowie pierwiastki wspierające i pobudzające proces odbudowy kości (krzem i magnez). Jednocześnie wprowadzenie montmorylonitu do prekursora włókien węglowych powinno pozwolić na uzyskanie włókien o zwiększonej porowatości. Stwierdzono bowiem w przypadku innego tworzywa, iż niewielki udział tego związku (3% na polimer) powoduje znaczące podwyższenie porowatości [13].

Celem podjętych badań była analiza wpływu wprowadzonego do tworzywa włókien PAN, na ich właściwości sorpcyjne i wytrzymałościowe.

Materiały i metody badawcze

Do wytwarzania włókien stosowano terpolimer PAN (firmy Zoltek). W badaniach stosowano montmorylonit Nanomer PGW (produkt Nanocor) o wymiarach płytek rzędu 800x550 nm oznaczonych na podstawie zdjęć z mikroskopu skaningowego. Odległości międzywarstwowe na poziomie 2,3 nm zostały wyznaczone na podstawie położenia pierwszego piksu na dyfraktogramach rentgenowskich WAXS. Charakterystykę roztworu przędzalniczego oznaczoną na podstawie odrębnych badań [14] przedstawiono w TABELI 1.

Włókna formowano metodą z roztworu na mokro przy zastosowaniu przędzarki wielkolaboratoryjnej umożliwiającej stabilizację parametrów technologicznych na założonym poziomie oraz ciągłą ich kontrolę. [15]

Badanie sorpcji wilgoci w 65 i 100% RH przeprowadzono zgodnie z Polską Normą PN-71/P-04635.

Retencje WVR oznaczono odnosząc masę zatrzymaną przez włókna wody po odwirowaniu próbki w czasie 10 minut z przyspieszeniem 10000 m s^{-2} , do masy suchej próbki. Przed odwirowaniem włókna były zanurzone w czasie 24 godzin w wodzie z dodatkiem związku powierzchniowo czynnego: 1% Rokafenolu NX-3.

Wytrzymałość właściwą włókien przy zerwaniu wyznaczono dla wiązki włókien według Normy Polskiej PN-85/P-04761/04, przy użyciu maszyny wytrzymałościowej typu Intron.

Współczynnik orientacji ogólnej wyznaczono metodą soniczną mierząc prędkość rozchodzenia się fali dźwiękowej w badanym włóknie i odnosząc otrzymaną wartość do włókna izotropowego. Pomiar wykonano przy pomocy Dynamic Modulus Tester PPM-5R Firmy Morgan Co.Inc. USA.

Dyskusja wyników

Założeniem pracy było uzyskanie włókien prekursoro-

tion to commonly used titanium alloys in the biomaterial engineering, polymeric materials such as polyglycolic acid [1], polylactide [2, 3] and carbon nanocomposites [4, 6] have become of spreading importance. Currently, carbon composites used in such applications as the reconstruction of knee joint [7, 8] and Achilles tendons [9] belong to the most common materials of that group. Besides appropriate biological properties, implant materials made from carbon fibers should show a high strength and increased porosity at the same time. Both the strength and porosity of carbon fibers depend directly on the structure of precursor fibers that is formed during fiber solidification and drawing [10-12]. The incorporation of montmorillonite (MMT) into precursor PAN fibers makes it possible to produce carbon fibers with new, unparalleled properties. A biocomposite made from MMT-containing carbon fibers will contain in its structure elements such as silicon and magnesium that support and activate the process of bone reconstruction. At the same time, the incorporation of MMT into the precursor PAN fibers to be processed into carbon fibers should allow one to prepare fibers with increased porosity as confirmed by the case of other fiber-forming polymer, where a low content of this compound (3% of polymer weight) considerably increased fiber porosity [13]. The aim of the present study was to assess the effect of MMT incorporated into PAN fibers on their sorption and strength properties.

Materials and methods

Fibers were prepared from PAN terpolymer of Zoltek. Montmorillonite under trade name Nanomer PGW was provided by Nanocor, its lamella dimensions 800 x 550 nm were determined from electron scanning microscope images. The inter-layer distances at a level of 2.3 nm were determined on the basis of the first peak position in X-ray diffractograms WAXS. The characteristics of spinning solution determined on the basis of separate measurements [14] are given in TABLE 1.

Fibers were spun by the wet process from solution with the use of a laboratory spinning machine that allowed the stabilization of technological parameters at a predetermined level under a continuous control [15] Moisture absorption at 65% and 100% RH was measured according to the Polish standard PN -71/P-04635. Water retention (WVR) was determined by relating the weight of water retained by fibers after centrifuging a sample for 10 min. at an acceleration of 10000 m s^{-2} , to the weight of a dry sample. Prior to centrifuging, fibers were immersed in water with an addition of surface-active agent: 1% Rokafenol NX-3. Fiber tenacity was measured according to the Polish standard PN-85/P-04761/04, using an Instron tensile testing machine. The coefficient of overall orientation was determined by the sonic method, measuring the velocity of acoustic wave propagation in the fiber under investigation and referring the obtained value to an isotropic fiber. Measurements were carried out by means of a Dynamic Modulus Tester PPM-5R of Morgan Co.Inc. (USA).

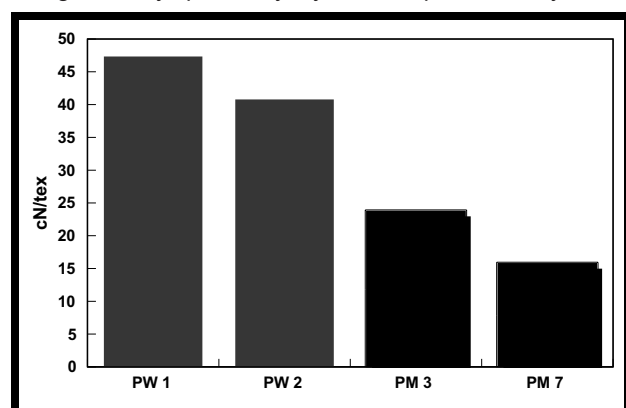
Lepkość istotna Intrinsic viscosity	Stężenie roztworu Concentration of solution [%]	Ilość MMT MMT content [%]	Parametr reologiczny n Rheological parameter n	Parametr reologiczny K Rheological parameter K
η [dL/g]				
1.29	22%	3%	0.953	29.9

TABELA 1. Charakterystyka polimeru i roztworu przędzalniczego.

TABLE 1. Characteristics of polymer and spinning solution.

wych zawierających w swojej budowie montmorylonit, charakteryzujących się dobrymi własnościami wytrzymałościowymi i sorpcyjnymi korelującymi z porowatością włókien.

Wprowadzenie nanododatku do roztworu przedłużającego spowodowało znaczące obniżenie podatności tworzywa na deformację, podobnie jak to miało miejsce w przypadku włókien zawierających SiO_2 . [16] Otrzymane włókna prekursorowe odznaczają się podobnymi wartościami sorpcji wilgoci w 65%RH w porównaniu do włókien bez montmorylonitu formowanych w analogicznych warunkach. (TABELA 2) W przypadku sorpcji wilgoci w 100% RH uwidacznia się nieznaczny wzrost tego parametru z poziomu 6.72% dla próbki PW 2 do poziomu 7.83% dla włókien zawierających MMT (próbka PM 7). Natomiast z wprowadzeniem do tworzywa MMT związany jest spadek retencji wody. Wartość tego wskaźnika dla włókien formowanych przy wyciągu filerowym na poziomie -40% spada z poziomu 24% (próbka PW 1) do poziomu 10.95% (próbka PM3). Jeszcze większą różnicę wykazują włókna formowane przy wyciągu filerowym na poziomie 10%, gdzie dla włókien bez montmorylonitu wartość retencji wody jest 3.5 razy większa niż dla włókien bez nanododatku. (TABELA 2) Tak duże różnice w wartości retencji wody mogą prawdopodobnie świadczyć o zmniejszeniu się udziału por dużych i bardzo dużych w całkowitej objętości por, co przy podwyższonej sorpcji wilgoci w 100% RH do poziomu 7,83% związana jest z korzystnym zwiększeniem udziału por małych i średnich. Wprowadzenie do tworzywa włókien montmorylonitu powoduje znaczące obniżenie wytrzymałości włókien związane ze zmniejszeniem podatności tworzywa na deformację w etapie rozciągania. Dla obu wartości wyciągu filerowego zaznacza się ponad 50% spadek wytrzymałości. (RYS. 1) Tak gwałtowny spadek wytrzymałości spowodowany może



RYS. 1. Wykres wytrzymałości właściwej dla włókien PAN z montmorylonitem i bez montmorylonitu.

FIG. 1. Diagram of tenacity of MMT-containing PAN fibers and PAN fibers.

być także ze skłonnością nanododatku do tworzenia aglomeratów, jak również z wysoce rozwiniętą strukturą porowatą. Potwierdzają to wartości stopnia orientacji ogólnej wyznaczonej metodą soniczną, które są znacznie niższe w przypadku włókien zawierających montmorylonit. (tabela 2) Wiadomo bowiem, że na wartość wskaźnika orientacji ogólnej bardzo duży wpływ wywiera występowanie wewnątrz włókna por oraz pustych przestrzeni, które w znaczący sposób powodują zmniejszenie prędkości rozchodzenia się fali dźwiękowej we włóknie.

Results and discussion

The intended aim of the present study was to prepare montmorillonite-containing precursor fibers with good strength and moisture absorption correlating with the fiber porosity. The incorporation of montmorillonite in the form of a nanoadditive into the spinning solution caused a considerable decrease in the polymer susceptibility to deformation, similarly as in the case of silica-containing fibers [16]. The obtained precursor fibers are characterized by similar values of moisture absorption at 65% RH in comparison to fibers without montmorillonite obtained under analogous conditions (TABLE 2). In the case of moisture absorption at 100% RH, there is a noticeable increase in this parameter from 6.71% for sample PW2 to 7.83% for MMT-containing fibers (sample PM7). On the other hand, the MMT addition causes the water retention of fibers to decrease from a level of 24% for fibers spun with an as-spun draw out ratio of -40% (sample PW1) to 10.95% (sample PM3). The decrease is even greater in the case of fibers formed with an as-spun draw out ratio of 10%, where the water retention of fibers without montmorillonite is 3.5 times higher than that of MMT-containing fibers (TABLE 2). Such differences in water retention may indicate that the content of large and very large pores in the total pore volume was decreased. Considering the increase in the moisture absorption at 100% RH to 7.83%, this fact is connected with a beneficial increase in the content of small and medium-sized pores.

Indeks próbki Sample symbol	Wyciąg filerowy As-spun draw ratio [%]	Rozciąg całkowity Total draw ratio [%]	Stopień orientacji ogólnej Degree of overall orientation	Sorpcja w 65% w.w. powietrza Sorption at 65% RH [%]	Sorpcja w 100% w.w. powietrza Sorption at 100% RH [%]	Retencja Water retention [%]
PW 1	-40	1054,03	0,79	2,05	6,34	24,0
PW 2	10	437,35	0,64	2,20	6,72	67,1
PM 3	-40	606,63	0,51	2,07	6,3	10,95
PM 7	10	453,42	0,57	2,27	7,83	18,84

TABELA 2. Własności sorpcyjne i stopień orientacji włókien PAN z montmorylonitem i bez montmorylonitu.

TABLE 2. Sorption properties and degree of orientation of PAN fibers with and without MMT.

The incorporation of MMT into the fiber-forming polymer brings about a considerable deterioration in fiber strength connected with the decreased polymer susceptibility to deformation during the drawing stage. With both values of as-spun draw out ration, there is a drop in fiber tenacity above 50% (FIG. 1). Such a big drop in strength may be also due to the susceptibility of the nanoadditive to form agglomerates as well as highly developed porous structure. This is confirmed by the values of the degree of overall orientation determined by the sonic method, which are considerably lower in the case of MMT-containing fibers (TABLE 2). It is known that the degree of overall orientation is greatly affected by pores and empty spaces inside fibers, which considerably decrease the velocity of acoustic wave propagation in fiber.

Summary

The developed conditions of producing precursor nanomontmorillonite-containing PAN fibers of a new gen-

Opracowano warunki wytwarzania nowej generacji prekursorowych włókien PAN zawierających nanododatek montorylonitu, posiadających wytrzymałość właściwą na poziomie 23,74 cN/tex. Otrzymane z takiego prekursora włókna węglowe przeznaczone będą do wytwarzania implantów wspierających i pobudzających proces odbudowy kości. Dalsze prace zespołu dotyczyć będą określenia wpływu parametrów formowania (wyciągu filerowego, rozciągu całkowitego oraz temperatury kąpieli zestalającej) na właściwości mechaniczne i strukturę porowatą otrzymanych włókien. Zostanie również oceniony wpływ działania ultradźwięków na zapobieganie aglomeracji nanododatku w roztworze przedzalniczym.

Podziękowania

Praca finansowana z grantu promotorskiego: 3T08E 03328.

Piśmiennictwo

- [1] S.Gogolewski, Int. J. Care Injured 2000,31, S-D28-32.
- [2] Rui A.Sousa, Rui L.Reis, Antonio M. Cunha, Michael J.Bevis, Composites Science and Technology 2003, 63, 389-402.
- [3] R.R.M.Bos, F.R.Rozema, G.Boering, A.J.Nijenhuis, A.J.Pennings, et al., Biomaterials 1991, 12, 33-38.
- [4] C.Morrison, R.Macnair, C.MacDonald, A.Wykman, I.Goldie, M.H.Grant, Biomaterials 1995,16, 987-992.
- [5] S.Błażewicz, J.Chłopek, A.Litak, C.Wajler, E.Staszko, Biomaterials 1997, 18, 437-439.
- [6] A.Ślósarczyk, M.Klisch, M.Błażewicz, J.Piekarczyk, L.Stobierski, A.Rapacz-Kmita, J. European Ceramic Society 2000, 20, 1379-1402.
- [7] G.Hehl, L.Kinzl, R.Reichel, Chirurg. 68, (1997), 1119.
- [8] A.C.Campbell, P.S.Rae, Ann. R. Coll. Surg. Engl. 77, (1995), 349.

eration make it possible to prepare fibers with a tenacity of 23.74 cN/tex being suitable for processing them into carbon fibers. The latter will be designed for making implants that can support and activate the process of bone reconstruction.

Further studies will concern the effect of fiber spinning parameters (as-spun draw out ratio, total draw ratio and the temperature of fiber solidification bath) on the mechanical properties and porous structure of the fibers as well as the effect of ultrasounds on the elimination of nanoadditive agglomeration in the spinning solution.

Acknowledgements

The study was financially supported by grant 3T08E 03328.

References

- [9] A.Górecki, W.Kuś, S.Błażewicz, A.Powroźnik, Chir. Narz. Ruchu Ortop. Pol. LV (2), (1990), 131.
- [10] S.P.Papkow, Chim. Włók. 4, (1981), 13.
- [11] T.Mikołajczyk, I.Krucińska, K.Kamecka-Jędrzejczak, Textile Res. J., 59, (1989), 557.
- [12] T.Mikołajczyk, I.Krucińska, Fibres&Textiles in Eastern Europe 3, (1995), 44.
- [13] T.Mikołajczyk, G.Janowska, et. al., Fibres&Textiles in Eastern Europe 1, (2004).
- [14] T.Mikołajczyk, M.Boguń, Fibres&Textiles in Eastern Europe Vol.13, (2005),28.
- [15] T.Mikołajczyk Zeszyty Naukowe PŁ nr 781, Rozprawy Naukowe Z 243, (1997).
- [16] T.Mikołajczyk, M.Boguń, A.Kowalczyk "Effect of fibre-spinning conditions on the properties of nanosilica-containing precursor PAN fibres", Fibres&Textiles in Eastern Europe - w druku.

RESORBOWALNE WŁÓKNA POLIMEROWE (PGLA) MODYFIKOWANE POWIERZCHNIOWO BIOSZKŁEM

BARBARA SZARANIEC*, KATARZYNA CHOLEWA-KOWALSKA**,
JAN CHŁOPEK*, STANISŁAW BŁAŻEWICZ*

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW,

* KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,

**KATEDRA TECHNOLOGII SZKŁA I POWŁOK AMORFICZNYCH
[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),74-77]

Wstęp

Implanty z polimerów resorbowalnych dzięki temu, iż degradują się in vivo do produktów nieszkodliwych dla organizmu i nie istnieje konieczność ich deimplantacji są coraz powszechniej stosowane w różnych obszarach medycyny. Szczególną popularnością cieszą się poliestry alifatyczne takie jak PLLA czy PGLA. Odpowiednio dobrane skład chemiczny oraz struktura pozwalają na zrównanie czasu resorpcji polimeru z czasem regeneracji zastępowania

BIOGLASS MODIFIED RESORBABLE POLYMER FIBRES (PGLA)

BARBARA SZARANIEC*, KATARZYNA CHOLEWA-KOWALSKA**,
JAN CHŁOPEK*, STANISŁAW BŁAŻEWICZ*

AGH-UST UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-684 KRAKÓW,

*DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,

**DEPARTMENT OF GLASS TECHNOLOGY AND AMORPHOUS
COATINGS

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),74-77]

Introduction

Resorbable polymer implants find increasing use in various areas of medicine, as they have the ability to degrade in vivo into products harmless to the body, while there is no need for implant removal. Aliphatic polyesters such as PLLA and PGLA are particularly popular materials. Properly adjusted chemical and structural composition allows to balance polymer resorption time with time of regeneration of tissues being replaced [1]. However in many prospective

nych tkanek [1]. Jednak do wielu potencjalnych zastosowań medycznych właściwości mechaniczne polimerów takie jak: wytrzymałość czy podatność na pękanie nie są wystarczające [2]. Znaczną poprawę tych parametrów można uzyskać poprzez wprowadzenie fazy wzmacniającej w postaci włókien do polimeru resorbowlanego i otrzymanie polimerowych kompozytów włóknistych. Wybór włókien jakie można zastosować w implantach medycznych jest jednak ograniczony. Stosuje się między innymi włókna węglowe, które posiadają bardzo dobrą wytrzymałość i wysoką biogodność, ale po resorpcji osnowy polimerowej jeszcze przez długi czas pozostają w organizmie [3]. Optymalnym rozwiązaniem byłoby wzmacnianie polimerów resorbowlanych również włóknami ulegającymi resorpcji. Odpowiednio zaprojektowane kompozyty tego typu mogą posiadać budowę gradientową, zarówno pod względem struktury jak i właściwości. Szczególnie interesujące dla zastosowań medycznych mogą być kompozyty z gradientem porowatości, modułu Younga oraz szybkości resorpcji poszczególnych faz. Chcąc wytworzyć tego typu kompozyty napotyka się jednak na problem technologiczny związany z połączeniem włókien z osnową. Przy próbie otrzymywania kompozytu z roztworu włókna ulegają natychmiast rozpuszczeniu (gdyż rozpuszczają się w takich samych rozpuszczalnikach jak osnowa), zaś w przypadku metod wytwarzania bazujących na masie stopionej takich jak wtrysk czy prasowanie topią się również włókna. Aby więc było możliwe wykorzystanie włókien resorbowlanych do wzmacniania polimerów resorbowlanych, konieczne jest zabezpieczenie ich powierzchni na czas procesu wytwarzania kompozytu. W tym celu możliwe jest zastosowanie selektywnych rozpuszczalników lub pośrednich warstw.

W niniejszej pracy przeprowadzono próby zabezpieczenia włókien PGLA przed działaniem rozpuszczalnika poprzez pokrywanie ich warstwami bioszkieł.

Materiały i metody

Badania przeprowadzono na włóknach (PGLA) wytworzonych w Katedrze Włókien Sztucznych na Wydziale Inżynierii i Marketingu Tekstyliów Politechniki Łódzkiej z kopolimeru glikolidu (17%) z L-laktydem (83%) otrzymanego w Centrum Chemii Polimerów PAN w Zabrze. Wyjściowe włókna PGLA pokrywano dwoma rodzajami bioszkieł (S2 i A2) z układu $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ o różnym składzie chemicznym, który przedstawiono w TABELI 1.

Aby ograniczyć ryzyko zaburzenia struktury i składu włókien, bioszkieła nanoszono stosując niskotemperaturową metodą zol-żel. Roztwory wyjściowe otrzymywano z następujących substratów: tetraetoksyortosilan $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS) (Merck, Germany), fosforan trietylu $\text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ (TEP) (Merck), azotan wapnia $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (POCh, Poland), etanol - jako rozpuszczalnik, kwas solny HCl - jako środek katalizujący, oraz woda destylowana [4].

Cienką warstwę nanoszono poprzez zanurzenie włókien w wyjściowych roztworach, a następnie ich suszenie - początkowo w temperaturze otoczenia, później w temperaturze 60°C. Część włókien pokrywano jednokrotnie, a część

rodzaj szkła/ glass type	SiO_2 [%mol]	CaO [%mol]	P_2O_5 [%mol]
S2	80	16	4
A2	40	54	6

TABELA 1 Skład bioszkieł stosowanych do pokrywania włókien PGLA.

TABLE 1 Composition of bioglass used for PGLA fibre coating.

medicinal applications mechanical properties of polymers such as strength and creep compliance do not meet the requirements [2]. Significant improvement of these parameters can be achieved by introduction of reinforcing phase in form of fibres into the resorbable polymer, and thus obtaining polymer matrix-fibre composites. The choice of fibres applicable in medical implants is relatively limited. Carbon fibres can be used, among others, as they present very good strength and high biocompatibility, however after the matrix resorption they remain within the body for a long period of time [3]. Reinforcement of resorbable polymers using resorbable fibres would be the optimal solution. Properly designed composites of this kind can have gradient-type structure and properties, respectively. Composites with gradients of porosity, Young modulus, and resorption rate would be of particular interest in medical applications. The attempt to fabricate such a composite would have to deal with technological problem related to joining fibres with the matrix. When trying to manufacture such composite from solution, fibres may become dissolved instantly, as they dissolve in identical solvents as the matrix material. In the case of moulding methods based on molten mass, such as pressing or injection, fibres can also melt. Therefore in order to make the use of resorbable fibres feasible for purpose of resorbable polymer reinforcement, their surface protection is necessary during the time of composite fabrication. To this aim, the use of selective solvents or intermediate layers seems feasible.

In this work the attempts have been made to protect the PGLA fibers by coating them with use of bioglass.

Materials and methods

The studies were carried out on fibres (PGLA) manufactured at Department of Man-Made Fibers, Faculty of Textile Engineering and Marketing of Technical University in Lodz made of glycol (17%) co-polymer with L-lactide (83%) obtained in the Centre of Polymer Chemistry in Zabrze, Poland. The initial PGLA fibres were coated with two types of bioglasses (S1 and A2) based on the system $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2$ with different chemical compositions, shown in TABLE 1.

In order to avoid the risk of disturbance of fibre structure and composition, the coatings of bioglasses were deposited using the low-temperature sol-gel method. Initial solutions were based on the following components: tetraethoxyorthosilicate $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS) (Merck, Germany), triethyl phosphate $\text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ (TEP) (Merck), calcium nitrate $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (POCh, Poland), ethanol - as solvent, HCl as catalytic agent, and distilled water [4].

Thin coatings were deposited by fibres immersion in initial solutions, followed by drying - initially at ambient temperature, and later at 60°C. Part of fibres was coated with single layer and another part with double layer. Four types of fibres were obtained this way:

PGLAA2x1-PGLA fibres coated with single layer of A2 bioglass

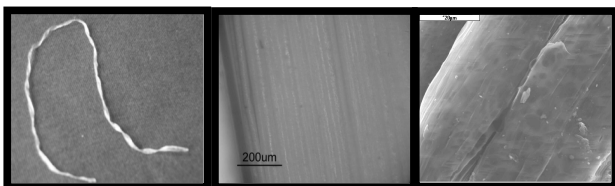
PGLAA2x2-PGLA fibres coated with double layer of A2 bioglass

PGLAS2x1-PGLA fibres coated with single layer of S2 bioglass

PGLAS2x2-PGLA fibres coated with single layer of S2 bioglass

The PGLA fibres with unmodified surfaces constituted the reference sample (FIG.1).

Polymer matrix composites were fabricated from the same co-polymer of glycolide (17%) with L-lactide (83%) reinforced with previously obtained fibres. The 10% PGLA solution in



RYS.1. Wyjściowe włókna PGLA (mikroskop optyczny, SEM).

FIG.1. The initial PGLA fibres (optical microscope, SEM).

dwukrotnie.

W ten sposób otrzymano cztery rodzaje włókien :

PGLA A2 x1-włókna PGLA pokryte jednokrotnie bioszkłem A2

PGLA A2 x2- włókna PGLA pokryte dwukrotnie bioszkłem A2

PGLAS2 x1-włókna PGLA pokryte jednokrotnie bioszkłem S2

PGLAS2x2-włókna PGLA pokryte dwukrotnie bioszkłem S2
Próbkę odniesienia stanowiły włókna PGLA wyjściowe niemodyfikowane (RYS.1).

Wykonano również kompozyty o osnowie polimerowej z tego samego kopolimeru glikolidu (17%) z L-laktydem (83%) wzmacniane otrzymanymi uprzednio włóknami. Włókna zalewano 10% roztworem PGLA rozpuszczonego w chloroku metylenu. Otrzymano cztery rodzaje kompozytów PGLA - modyfikowane włókno PGLA (PGLA-PGLAA2x1, PGLA-PGLAA2x2, PGLA-PGLAS2x1, PGLA-PGLAS2x2) w postaci cienkich błonek. Eksperyment ten pozwolił na praktyczne sprawdzenie skuteczności działania warstw bioszkle, które miały stanowić zabezpieczenie resorbowalnych włókien przed ich rozpuszczeniem.

W celu oceny trwałości naniesionej warstwy bioszkle badane włókna inkubowano w wodzie destylowanej w temp. 37°C przez miesiąc i rejestrowano zmiany przewodnictwa elektrycznego wody oraz obserwowano zmiany zachodzące na powierzchni włókien.

Wszystkie włókna i kompozyty poddano obserwacjom mikroskopowym (mikroskopia optyczna i elektronowa) oraz zbadano ich skład chemiczny przy pomocy mikroanalizy rentgenowskiej.

Wyniki

Obserwacje mikroskopowe wykazały zróżnicowanie naniesionych warstw. Bioszkło A2 penetrowało pomiędzy włókna i pokrywało je równomiernie (RYS.2a), podczas gdy bioszkło S2 tworzyło grubsza i spękaną warstwę na powierzchni całej wiązki włókien (RYS.2b).

Na podstawie badań przeprowadzonych w wodzie destylowanej można stwierdzić, że trwałość naniesionych warstw bioszkle jest niewielka. Ulegają one szybkiemu rozpuszczeniu, o czym mogą świadczyć gwałtowny wzrost przewodnictwa elektrycznego wody (RYS.3) oraz przeprowadzone obserwacje mikroskopowe. RYS.4 przedstawia fotografie powierzchni badanych włókien po inkubacji w wodzie. W żadnym przypadku nie jest już widoczna powierzchniowa warstwa bioszkle.

Wszystkie naniesione powłoki bioszkle okazały się skuteczną barierą ochronną dla rozpuszczalnika (chloroku metylenu) (RYS.5). O ile przy próbie zalania niemodyfikowanych włókien PGLA roztworem PGLA już nawet opary chloroku metylenu rozpuszczają je błyskawicznie, o tyle w przypadku włókien modyfikowanych bioszkłem nie zaobserwowano zmian w ich mikrostrukturze, o czym mogą świadczyć mikrofotografie kompozytów (RYS.6). Po zalaniu włókien

methylene chloride was poured on fibres. This way four types of PGLA composites-modified PGLA fibres (PGLA-PGLA A2x1, PGLA- PGLAA2x2, PGLA-PGLAS2x1, PGLA-PGLA S2x2) in form of thin films were prepared. This experiment enabled to prove the efficiency of bioglass layers protecting resorbable fibres from dissolution.

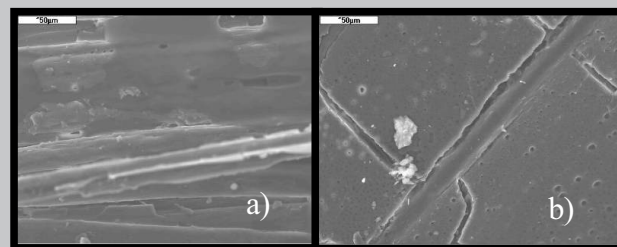
In order to estimate the stability of deposited bioglass layers, the fibres were incubated in distilled water at 37°C for one month while the variations of electrical conductivity have been registered as well as the changes on fibre surfaces. All fibres and composites were subjected to microscopic observations (optical and scanning) and their compositions have been examined by X-ray microanalysis.

Results

Microscopic observations revealed the differences in deposited layers. Bioglass A2 penetrated amongst the fibres and coated them uniformly (FIG.2a), whereas the S2 bioglass formed thicker but cracked layer on the surface of the whole bundle of fibres (FIG.2b).

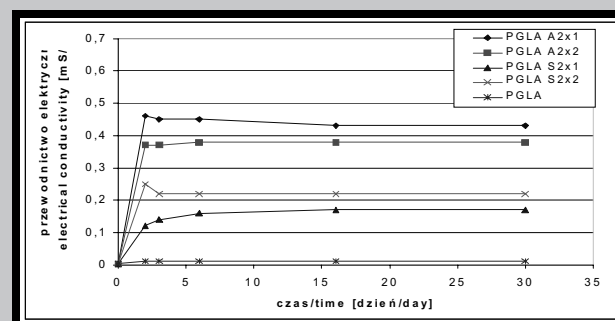
It has been concluded based on experiments performed in distilled water that durability of deposited bioglass layers is limited. They are fast dissolved, which is proved by strong increase of electrical conductivity of water (FIG.3) and microscopic observations. FIG.4 shows photographs of surfaces of observed fibres after incubation in water. The layer of bioglass can not be seen in any of the examined cases. All deposited bioglass layers appeared to be the efficient protective barrier for the solvent (methylene chloride) (FIG.5). With the attempt of pouring the PGLA solution onto the PGLA fibres, it turned out that methylene chloride vapours alone dissolve these fibres almost instantaneously. In the case of bioglass modified fibres no microstructural changes were observed in contact with the solvent, which can be proved by composite microphotographs (FIG.6).

After pouring the solvent only on these fibres it can be noticed that layers of A2 bioglass protect them better than bioglass S2 layers. In the samples with S2 bioglass after some 10 minutes fibres start to separate and do not form coherent strand. However in both cases even after an hour



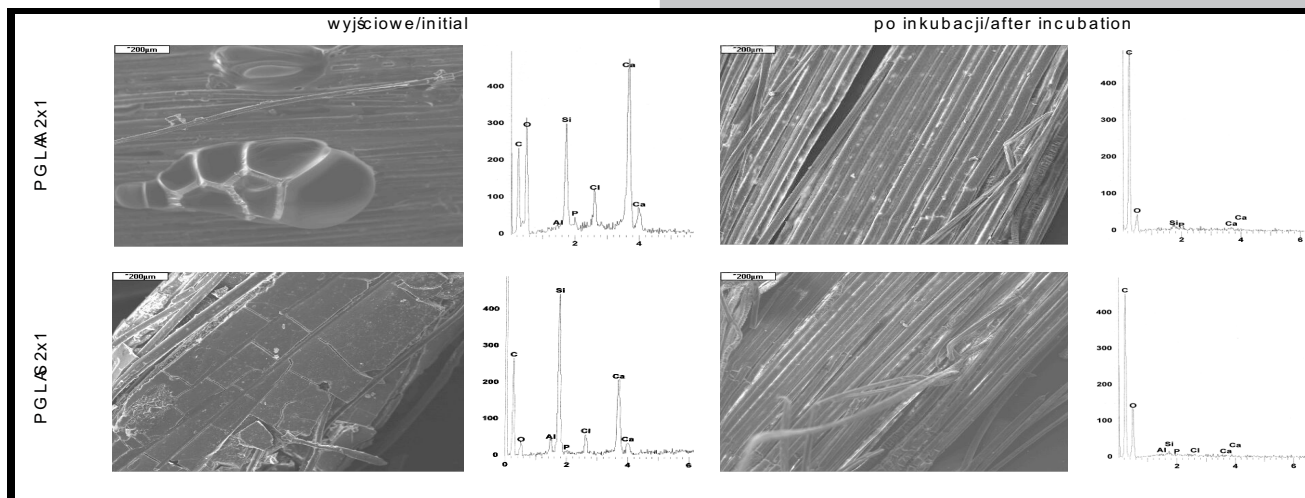
RYS. 2. Mikrofotografie SEM a) włókno PGLA A2x1, b) włókno PGLA S2x1 (pow. 500x).

FIG. 2. The SEM microphotographs a) PGLA fibre+A2x1, b) PGLA fibre+S2x1 (mag. 500x).



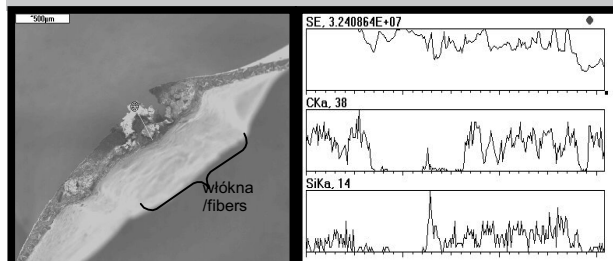
RYS. 3. Przewodnictwo elektryczne wody.

FIG. 3. Electrical conductivity of water.



RYŚ. 4. Mikrofotografie SEM włókien PGLA modyfikowanych bioszkłem A2 i S2 wyjściowych i po tygodniowej inkubacji w wodzie destylowanej (pow.100x) oraz analiza EDS.

FIG. 4. SEM microphotographs and EDS analyses of PGLA fibres modified with bioglass A2 and S2: initial and after 1 week incubation in distilled water (mag.100x).



RYŚ. 5. Fotografia SEM kompozytu PGLA-włókno PGLA S2x1 (pow.50x) oraz analiza EDS wzdłuż linii przekroju.

FIG. 5. The SEM photograph of PGLA-PGLA fibre composite S2x1 (mag.50x) together with EDS analysis along the cross-section line.

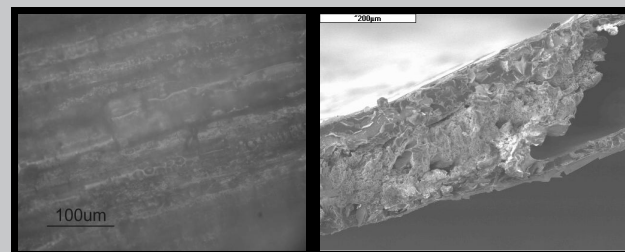
samym rozpuszczalnikiem widoczne jest, iż warstwy z bioszkle A2 chronią je nieco lepiej niż z bioszkle S2. W próbkach z bioszkłem S2 po ok. 10 minutach włókna zaczynają się rozdzielać i przestają tworzyć spójną wiązkę. Jednak w obu przypadkach jeszcze po godzinie włókna nie ulegają rozpuszczeniu i są nadal widoczne. Nie zaobserwowano natomiast różnicy między zachowaniem się włókien pokrywanych bioszkłem jedno- i dwukrotnie.

Wnioski

1. Powierzchniowa modyfikacja włókien PGLA bioszkłem pozwala na ich skuteczne zabezpieczenie przed rozpuszczalnikami.
2. Warstwy z bioszkle o dużej zawartości krzemionki S2 są spękanne i w nieco mniejszym stopniu chronią włókno niż warstwy A2.
3. Zastosowanie pośrednich warstw z bioszkle stwarza możliwość uzyskiwania resorbowalnych kompozytów włóknistych (PGLA-PGLA).

Podziękowania

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji w ramach projektu PBZ-KBN-100/T08/2003.



RYŚ. 6. Fotografie kompozytów PGLA-włókno PGLA a)S2, b)A2 (mikroskop optyczny, SEM).

FIG. 6. Photographs of PGLA-fibre PGLA composites: a)S2, b)A2 (optical microscope, SEM).

the fibres are not dissolved and are still visible. There was no difference in behaviour of fibres coated with one and two layers.

Conclusions

1. Surface modification of PGLA fibres with use of bioglass enables for their efficient protection against solvent.
2. Layers of high-silica bioglass S2 are cracked and protect fibre to a lesser extent than layers of A2 bioglass.
3. Application of intermediate bioglass layers creates the opportunity to obtain resorbable fibre composites (PGLA-PGLA).

Acknowledgements

This work was supported by the Minister of Science and Information Society Technologies Project PBZ-KBN-100/T08/2003

Piśmiennictwo

- [1] B.L. Seal, T.C. Otero, A. Panitch: Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering* 34 (2001), 147-230.
- [2] J. Chłopek, G. Kmita: Non-metallic composite materials for bone surgery, *Engineering Transaction*, vol. 2, 3 (2003), 307 - 323.
- [3] U.K. Debnath, J.A. Fairclough, R.L. Williams: Long-term local effects of carbon fibre in the knee. *The Knee* vol. 11 (2004), 259-264.
- [4] R. Sindut, M. Łączka, K. Cholewa-Kowalska, J. Najman: Bio-active glass coating, *Materials Science-Poland*, Vol. 23, No. 1 (2005).

BADANIE WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH I HISTOMORFOMETRYCZNYCH TKANKI KOSTNEJ KOŚCI UDOWEJ CZŁOWIEKA

R.BĘDZIŃSKI*, A.OSTROWSKA*, K.ŚCIGAŁA*, A.MAZURKIEWICZ**

*POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, UL ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371
WROCŁAW

**AKADEMIA TECHNICZNO-ROLNICZA, UL.KALISKIEGO 7, 85-763
BYDGOSZCZ
ANNA.OSTROWSKA@PWR.WROC.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),78-80]

Wprowadzenie i cel pracy

Staw biodrowy jest jednym z najbardziej obciążonych elementów naszego organizmu, dlatego też złamania kości udowej, nierzadko z przemieszczeniami, są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów u osób starszych w krajach wysoko rozwiniętych. Z uwagi na ciągłe obciążenie przenoszone przez staw biodrowy, zgodnie z prawem Wolffa, przystosował on swoją budowę, zarówno zewnętrzną jak i wewnętrzną, do panujących obciążeń. Masa ciała przenoszona jest z miednicy na głowę kości udowej, w której układ beleczek kostnych dostosowuje się do trajektorii największych naprężeń.

Na podstawie obserwacji klinicznych stwierdzono, że zmiany w zakresie biomechaniki stawu biodrowego (szczególnie te związane z wiekiem), powodując zmiany w budowie kości mogą prowadzić do powstawania dysfunkcji stawu. Przykładem takiej adaptacji jest zmiana wartości kąta szyjko-wo-trzonowego, który u osób młodych wynosi około 135° a wraz z wiekiem dochodzi do 90°. Zmiana tego kąta pociąga z kolei za sobą, zmianę kąta ułożenia beleczek kostnych w głowie kości udowej z 35° do 90°. Zmiany adaptacyjne, wywołane przystosowywaniem kości do panujących obciążeń, w stanach zaburzenia równowagi (przeciążenia) wraz z dodatkowymi czynnikami takimi jak wiek czy jakość kości prowadzić mogą do złamań. U osób w podeszłym wieku, najczęściej dochodzi do złamań krętarzowych, których główną przyczyną wydają się być: zrzesotnienie kości, utrata beleczkowania oraz zwiększenie jam szpikowych kosztem elementów strukturalnych, czyli zmiany związane z osteoporozą. Z drugiej strony do złamań kości udowej dochodzi bardzo często u osób z chorobą zwyrodnieniową, określaną jako zespół chorobowy, którego główną przyczyną jest dysproporcja pomiędzy obciążeniem a wytrzymałością mechaniczną chrząstki stawowej.

Zmiany w strukturze tkanki kostnej prowadzą do zmian jej parametrów mechanicznych i dlatego w pracy podjęto się próby znalezienia relacji pomiędzy właściwościami strukturalnymi a mechanicznymi. Do realizacji celu wykorzystano nowoczesne techniki pomiarowe takie jak: mikroskopia skaningowa czy mikrotomografia rentgenowska.

Materiał i metoda

Z uwagi na fakt, że najczęstszymi przyczynami złamań kości udowej są osteoporoza i choroba zwyrodnieniowa kości, przedmiot badań stanowiły preparaty pochodzące od osób, u których doszło do złamań z tego powodu. Dodatkowo, trzecią grupę, referencyjną, stanowiły preparaty sek-

THE INVESTIGATIONS OF MECHANICAL AND HISTOMORPHOMETRIC PROPERTIES OF HUMAN FEMUR CANCELLOUS BONE

R.BĘDZIŃSKI*, A.OSTROWSKA*, K.ŚCIGAŁA*, A.MAZURKIEWICZ**

*POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, UL ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371
WROCŁAW

**AKADEMIA TECHNICZNO-ROLNICZA, UL.KALISKIEGO 7, 85-763
BYDGOSZCZ
ANNA.OSTROWSKA@PWR.WROC.PL

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),78-80]

Introduction and purpose of study

The hip is one of the most loaded element in the human body. Hip fracture is a serious condition that has been found to increase morbidity and mortality to elderly men and women, especially community-dwelling ones. Nowadays etiological factors should be known better if one wants to recognize the individuals at high risk. Also, the treatment of displaced femoral neck fractures has been controversial, and the factors leading to a functional outcome are not known well. It has also been postulated that the etiologies of the two main hip fracture types, femoral neck and trochanteric fractures, are different. Knowledge of these differences would also help us to improve the prevention of hip fracture. According to Wolff's law, the permanent loaded hip is well-motivated and adapts his inner and outer architecture to the environment. The body mass, is transferred through the pelvis to femur bone, where the trabeculae align along stress trajectories. This theorem has the important corollary that affects architecture of cancellous bone and determines its mechanical properties.

Based on clinical observation it can be found that changes in biomechanical conditions of a hip (especially connected with age), which provoke the changes in architecture, can be caused by hip dysfunction. The example of functional adaptation is a change in the value of neck/shaft angle which varies from at average 135°, for young healthy people, to 90° for elder one. Eventually this alteration provoke the change in value of trabeculae direction angle from 35° to 90°. Decreased femoral shaft cortical thickness has been reported to predict trochanteric fractures, which is compatible with the different mechanisms of these fracture types. The etiopathology of the hip fracture is multifactorial, but there are three main causes that play an important role in the etiopathology of hip fractures: age, diseases and trauma. Bone loss affecting bone strength usually increases by aging. Loss of weight during aging affects the local shock absorbers, reducing especially muscles and increasing the risk of fracture after the fall. Other important principles are the mechanical properties of the material from which the structure is made and the location and direction of the loads to which the structure is subjected during service.

The purpose of this study was to investigate the relationships between the structural parameters of cancellous bone, to determine their correlation to the mechanical properties and to evaluate which parameters are important for maintaining bone strength and integrity.

cyjne nasady bliższej kości udowej pochodzące od osób, u których nie rozpoznano zmian chorobowych. Do określenia parametrów strukturalnych przygotowano cylindryczne próbki o średnicy 10mm i wysokości 8,5mm, które badano z użyciem mikrotomografii rentgenowskiej, uzyskując obrazy struktury kostnej z rozdzielczością 37mm. Następnie, za pomocą napisanego specjalnie do tego celu, w języku DELPHI, programu komputerowego HISTOMER, określono właściwości histomorfometryczne (parametry MIL oraz fabric elipsy) dla każdej z próbek. Do określenia właściwości mechanicznych takich jak: moduł Young'a czy wytrzymałość, w próbie ściskania jednoosiowego użyto maszyn wytrzymałościowych MTS 858 MiniBionix oraz MTS Synergie 100.

Właściwości histomorfometryczne

Anizotropia strukturalna może być mierzona przy użyciu metod pomiarowych opartych na stereologii, generujących jako rozwiązania: elipsę, elipsoidę lub odpowiednio dodatnie tensory drugorzędowe tekstury. W pracy wykorzystano, zaproponowaną w 1974 przez Whitehouse'a, metodę MIL (ang. mean intercept length - metoda "średniego odcinka długości"). Metoda ta opiera się na zliczaniu liczby

$$MIL = \frac{l_{\text{całk}}(\omega)}{n_{\text{przecięcia}}}$$

przecięć pomiędzy wprowadzaną siatką równoległych linii a granicą kość / wolna przestrzeń [4].

gdzie: $l_{\text{całk}}$ - całkowita długość linii na przekroju

ω - kąt pomiaru

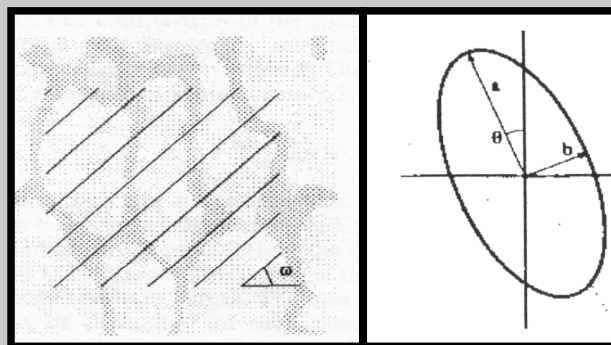
$n_{\text{przecięcia}}$ - liczba przecięć pomiędzy (porą a tkanką)

W pracy [1] Turner zauważył, że jeśli otrzymane wartości MIL, naniesiemy na biegunowy układ współrzędnych to otrzymamy elipsę (ang. fabric ellipse), której parametry są sposobem ilościowego opisu dwuwymiarowej anizotropii (wykreślenie elipsy pozwala na zobrazowanie istnienia "uprzywilejowanego" kierunku w danym przekroju).

Material and methods

Because of the fact that the most frequent causes of hip fractures seems to be osteoporosis and coxarthrosis, our investigations were carried out on twelve human femur heads. The basic study series consisted of 4 human femur heads with coxartrotal fracture, 4 heads with osteoporotical fracture and 4 heads from healthy people cases making a control group.

The size of bone cylindrical sample was 10x8,5 mm. To analyse bone structure 3D method like m-CT method was used. To determine histomorphometrical properties (MIL and fabric ellipse), the m-CT scans (with 37 mm resolution) and HISTOMER program were used. Strength tests using MTS MiniBionix and MTS Synergie 100 machines were also carried out to estimate the bone stress-strain characteristics, especially for determination values of Young's modulus and yield stress in compression.

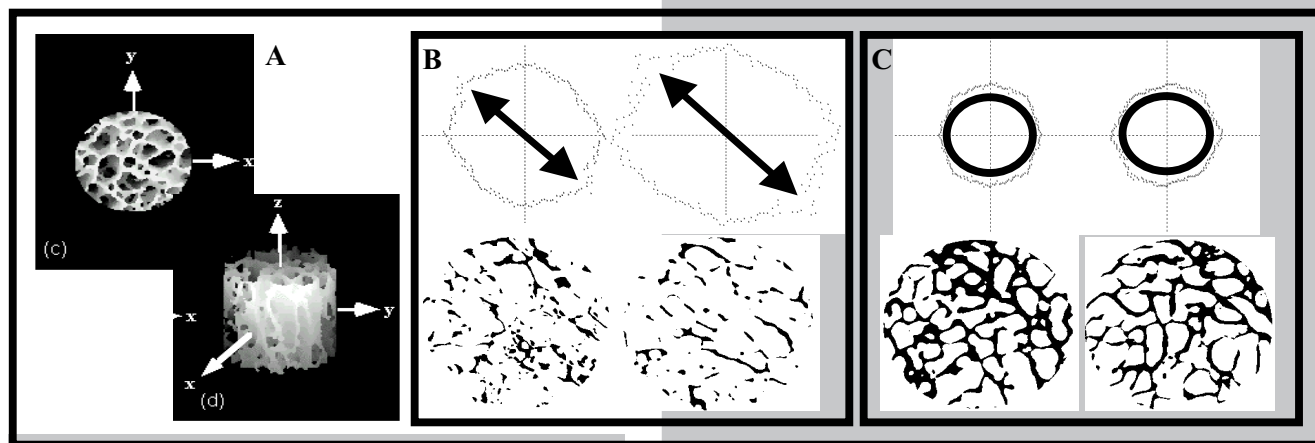


RYS. 1. Fabric ellipse, (C.H.Turner 1991) [4].

FIG. 1. Fabric ellipse, (C.H.Turner 1991) [4].

Histomorphometric properties

A complete representation of textural or structural anisotropy, according to Turner [1], using stereological methods involved an ellipse, an ellipsoid or fabric tensors.



RYS. 2 A). Rekonstrukcja obrazu otrzymanego za pomocą mikrotomografii rtg, B). Przykładowe skany i fabric elipsy dla próbki osteoporotycznej (z zaznaczeniem uprzywilejowanego kierunku); C). Przykładowe skany i fabric elipsy dla próbki coxarthrotycznej.

FIG. 2 A). The reconstruction of m-CT scan. B). The images and fabric ellipses for osteoporotic samples (with "preferential" direction); C The images and fabric ellipses for coxarthrotic samples.

$$MIL = \frac{l_{\text{całk}}(\omega)}{n_{\text{przecięcia}}}$$

To measure structural anisotropy of cancellous bone we used MIL method proposed in 1974 by Whitehouse. Whitehouse measured the mean intercept length in cancellous bone as a function of direction on polished plane sections. The mean intercept length is the distance between two bone/marrow interfaces measured along line (FIG.1).

where: l_{entire} - entire section length

Analizując wykresy 3 i 4, na których przedstawiono wyniki badań wytrzymałościowych, możemy zaobserwować spadek wartości modułu Young'a (o 3,2%) oraz wytrzymałości na ściskanie (o 34%) w przypadku próbek z kości osteoporotycznej, w stosunku do grupy referencyjnej. Natomiast dla próbek coxartrotycznych obserwujemy wzrost tych wartości.

Podsumowanie

Otrzymane wyniki, pozwalają na stwierdzenie, że struktura gąbczasta kości osteoporotycznej (RYS.2B) rozrzedza się, natomiast kości zwyrodnieniowej (RYS.2C) zagęszcza się, znajduje to swoje odzwierciedlenie w wynikach analizy wartości promieni fabric elipsy dla poszczególnych próbek, w programie HISTOMER. Do podobnych wniosków prowadzą badania histologiczne próbek, a rezultaty te znajdują również potwierdzenie w otrzymanych wartościach parametrów mechanicznych.

Warto również podkreślić, że próbki z tkanki osteoporotycznej wykazują mocno uprzywilejowany kierunek, co może świadczyć o silnej anizotropii strukturalnej tkanki, i co może potwierdzać tezę Chang'a [2], która stanowi, iż właściwości gęstych kości mają charakter izotropowy, a te o mniejszej gęstości bardziej anizotropowy.

Podziękowania

Niniejsza praca stanowi część projektu badawczego No.5 T07A 032 25, finansowanego przez Ministra Nauki i Informatyzacji.

Piśmiennictwo

- [1] Turner C.H., Cowin S.C., Rho J.Y., Asman R.B., Rice J.C., "The fabric dependence of the orthotropic elastic constants of cancellous bone" J Biomech Vol. 23, (1990), pp.549-561.
- [2] Chang W.C., et al., "Uniaxial Yield Strains for Bovine Trabecular Bone are Isotropic and Asymmetric" J Orthopaedic Research Vol.17, (1999), pp.582-585.

ω - angle

$n_{\text{intersection}}$ - the number of bone/marrow interfaces

Turner [1] pointed out that when the measured MIL values are plotted in a polar diagram as a function of the angle ω , then this diagram has a shape of an ellipse. The parameters of this ellipse are the manner of two-dimensional anisotropy description (the ellipse draw presents an "preferential" direction on analysed section).

Mechanical properties

Results of investigations carried out (fig. 3 and 4) shows a decrease in Young's modulus value (3,2%) and in compressive yield stress value (34%) for osteoporotic samples as compared to the reference samples. However, for coxartrotic samples we observe an increase of those values.

Recapitulation

It can be seen from the figures 2B and 2C that the structure of cancellous bone rarefy (this is also shown by a fabric ellipse) while become dense for coxartrotic samples. Those observations was also confirmed by histological test that were carried. Moreover samples of cancellous bone appear to have highly "preferential" direction. This can be an evidence of the structural anisotropy of tissue and in this way confirm a Chang's theorem that properties of dense bones has an isotropic pattern while for rarefy bone this pattern is more anisotropic.

Acknowledgements

This work has been partially supported by the Minister of Science and Information Society Technologies. Project No.5 T07A 032 25.

References

- [3] Ostrowska A., Mazurkiewicz A., Topoliński T., "Static strength of samples of trabecular bone in relations to the basic coefficients of architecture" 21st Symposium on Experimental Mechanics of Solids 13-16 October 2004 in Jachranka, Poland.
- [4] Odgaard A., "Three-Dimensional Methods for quantification of cancellous bone architecture", Bone Vol.20(4), (1997), pp.315-328.

WSTĘPNE BADANIA NAD DEGRADACJĄ WŁÓKIEN Z KOPOLIMERU GLIKOLIDU Z L-LAKTYDEM: ZMIANY WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNYCH

JOANNA BUCZYŃSKA*, ELŻBIETA PAMUŁA*,
STANISŁAW BŁAŻEWICZ*, TERESA MIKOŁAJCZYK**,
ANDRZEJ KURZAK**, PIOTR DOBRZYŃSKI***

*AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, KATEDRA BIOMATERIAŁÓW, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

**POLITECHNIKA ŁÓDZKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII I MARKETINGU TEKSTYLIÓW, KATEDRA WŁÓKIEN SZTUCZNYCH, UL. ŻEROMSKIEGO 116, 90-543 ŁÓDŹ

***CENTRUM CHEMII POLIMERÓW, POLSKA AKADEMIA NAUK, UL. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34/20, 41-819 ZABRZE

Streszczenie

Resorbowalne włókna z kopolimeru glikolidu z L-laktydem formowano metodą z roztworu na mokro. Za pomocą chromatografii żelowej (GPC) zbadano wpływ procesu formowania na zmianę masy cząsteczkowej tworzywa włókiennego. Mikrostrukturę włókien oceniono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Włókna poddano inkubacji w buforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) w temperaturze 37°C przez 25 tygodni. Właściwości mechaniczne włókien: wytrzymałość na rozciąganie, moduł Younga i odkształcenie zniszczenia zmierzono w funkcji czasu inkubacji *in vitro*. Badania wykazały, że otrzymane włókna charakteryzowały się stosunkowo słabymi właściwościami mechanicznymi i ulegały degradacji w ciągu 15 tygodni.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),81-84]

Wprowadzenie

Inżynieria tkankowa jest interdyscyplinarną dziedziną wiedzy, której celem jest przywrócenie, podtrzymanie i poprawa funkcjonowania uszkodzonych tkanek, za pomocą substytutów zawierających komórki. Biomateriały odgrywają tutaj ważną rolę, ponieważ pełnią funkcję matrycy dla wzrostu komórek, proliferacji i formowania tkanek w trójwymiarowe struktury. Do wytwarzania porowatych przestrzennych podłoży często stosuje się syntetyczne polimery biodegradowalne. Polilaktydy (PLLA, PDLA, PDLLA), poliglikolid (PGA) i ich kopolimery (PGLA) są biogodne, bioresorbowalne; posiadają dobre właściwości mechaniczne oraz stosunkowo łatwo można je przetwarzać w przestrzenne porowate podłoża [1]. Najbardziej popularnymi metodami otrzymywania porowatych podłoży dla inżynierii tkankowej są: wypłukiwanie soli, separacja faz i spienianie gazem [2]. Niestety podłoża otrzymane tymi technikami cechuje izotropia właściwości. Z drugiej strony naturalne tkanki (np. ścięgna, kość, skóra) mają właściwości anizotropowe wynikające z obecności w nich białek fibrylarnych, takich jak: kolagen czy elastyna. Nowym podejściem w projektowaniu podłoży jest otrzymywanie porowatych struktur wykonanych z włókien resorbowalnych, które lepiej naśladują naturalne tkanki.

Jedną z technik otrzymywania włóknistych podłoży jest metoda elektroprzędzenia. Metoda ta pozwala na otrzymy-

PRELIMINARY STUDIES ON HYDROLYTIC DEGRADATION OF POLY(GLYCOLIDE-CO-L- LACTIDE) FIBERS: MECHANICAL PROPERTIES VARIATIONS

JOANNA BUCZYŃSKA*, ELŻBIETA PAMUŁA*,
STANISŁAW BŁAŻEWICZ*, TERESA MIKOŁAJCZYK**,
ANDRZEJ KURZAK**, PIOTR DOBRZYŃSKI***

*AGH-UST UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, DEPARTMENT OF BIOMATERIALS, AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

**TECHNICAL UNIVERSITY OF LODZ, FACULTY OF TEXTILE ENGINEERING AND MARKETING, DEPARTMENT OF MAN-MADE FIBRES, ŻEROMSKIEGO 116 STR, 90-543 LODZ POLAND

***CENTRE OF POLYMER CHEMISTRY, POLISH ACADEMY OF SCIENCES, UL. CURIE-SKŁODOWSKIEJ 34/20, 41-819 ZABRZE, POLAND

Abstract

Resorbable poly(glycolide-co-L-lactide) fibers were spun from solution by the wet process. The influence of spinning process on the molecular mass changes of the fibre-forming polymer was evaluated by gel permeation chromatography (GPC). The surface of fibres was characterized by scanning electron microscopy (SEM). Fibres were incubated in phosphate buffered saline (PBS) at 37°C for 25 weeks. Mechanical properties of the fibers: tensile strength, Young's modulus and elongation at break were measured as a function of degradation time *in vitro*. The results show that the fibers have quite weak mechanical properties and degrade after 15 weeks *in vitro*.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),81-84]

Introduction

Tissue engineering is an interdisciplinary field, which aims at restoring, maintaining or improving damaged tissue function by using substitutes which include cells. Biomaterials play an important role in tissue engineering because they serve as matrices for cellular ingrowth, proliferation, and new tissue formation in three dimensions. To fabricate porous scaffolds synthetic biodegradable polymers are often used. Polylactides (PLLA, PDLA, and PDLLA), polyglycolide (PGA) and their copolymers (PGLA) are biocompatible, biodegradable; they have good mechanical properties and can be easily processed into three-dimensional structures [1]. The most common methods to produce porous scaffolds for tissue engineering applications are: porogen leaching, phase separation or gas foaming techniques [2]. Unfortunately, the scaffolds obtained by all these techniques have isotropic properties. On the other hand, natural tissues (eg. tendons, bone, skin) have often anisotropic properties, resulting from presence of fibrous proteins, such as collagen or elastin. A novel approach in scaffolds' designing is to produce porous structures made of resorbable fibers, which can better mimic natural tissues.

Fibrous scaffolds can be obtained by electrospinning. This technique enables production of fibrous scaffolds from PGLA and poly-ε-caprolactone. The diameter of resulting fibers is usually below 1 μm. [3-7]. Alternative methods used to produce fibrous resorbable materials are: melt spinning and

81

wanie włóknistych podłoży z PGLA oraz poli-ε-kaprolaktanu. Średnica włókien otrzymanych tą techniką jest zwykle poniżej 1 μm [3-7]. Włókniste materiały resorbowalne można też formować ze stopu bądź z roztworu na mokro lub na sucho. W metodzie formowania z roztworu nie dochodzi do termicznej degradacji polimeru, z czym należy się liczyć w przypadku formowania ze stopu. Metoda formowania z roztworu pozwala na wytwarzanie włókien w szerokim zakresie składu chemicznego i masy cząsteczkowej [8]. Celem pracy było otrzymanie włókien z kopolimeru glikolidu z L-laktydem metodą z roztworu na mokro oraz ocena ich właściwości wytrzymałościowych, budowy powierzchni (za pomocą mikroskopu skaningowego) i kinetyki degradacji (na podstawie badań właściwości mechanicznych).

Materiały

Glikolid i L-laktyd (Purac, Holandia) były oczyszczane przed użyciem poprzez rekrytalizację z suchego octanu etylu, a następnie suszone w suszarce próżniowej w temperaturze pokojowej. Kopolimeryzację glikolidu z laktydem prowadzono w stopie w temperaturze 100°C z użyciem inicjatora $Zr(acac)_4$ wykorzystując w celu odgazowania stopu konwencjonalną linię próżniową, zgodnie z metodą opisaną poprzednio [9]. Stosunek molowy inicjatora do monomerów wynosił $1,2 \times 10^{-3}$.

Włókna formowano metodą z roztworu na mokro. Roztwór polimeru sporządzono przez rozpuszczenie PGLA w N,N-dimetyloformamidzie (DMF). Stężenie roztworu wynosiło 20%. Stosowano przędzarkę wielkolaboratoryjną, której konstrukcja umożliwia stabilizację parametrów procesowych i ciągłą ich kontrolę. Używano dyszy przędzalniczej 240-otworowej o średnicy otworków 0,08 mm. Proces zestalania prowadzono w wodnej kąpeli zawierającej rozpuszczalnik (20-40%) w temperaturze 8-15°C. Proces rozciągu realizowano jednoetapowo w kąpeli plastyfikacyjnej o zawartości rozpuszczalnika wynoszącej około 15-30% w temperaturze 30-50°C. Po usunięciu rozpuszczalnika włókna suszono w warunkach izometrycznych w niskiej temperaturze.

Metody

Właściwości materiałów

Skład chemiczny badanego kopolimeru określono za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego 1H NMR (spektrometr firmy Varian Unity Inova). Masy cząsteczkowe M_n i M_w kopolimeru i otrzymanych włókien wyznaczono stosując metodę chromatografii żelowej GPC za pomocą chromatografu Spectra Physics SP 8800.

Średnica włókien PGLA była mierzona na Lanametrze stosując okular z podziałką mikrometryczną, jako uśrednienie pomiarów 25 pojedynczych włókien.

Obserwacje mikrostruktury włókien przeprowadzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego JSM 5400 JEOL przy powiększeniach odpowiednio 50, 500 i 1000 razy. Przed analizą próbki napyłono cienką warstwą węgla w celu nadania im właściwości przewodzących.

Badania degradacji

Badania degradacji prowadzono w roztworze NaCl (0.9%) buforowanym 24 mM Na_2HPO_4 i 16 mM KH_2PO_4 (PBS) o pH równym 7.0. Pęczek włókien pocięto na kawałki o długości około 8 cm umieszczono w pojemnikach, zalano 100 ml roztworu PBS i przetrzymywano w temperaturze 37°C. przez 25 tygodni. Co 2 tygodnie wyjmowano po 2 próbki, płukano trzy razy w ultra czystej wodzie (PureLab UHQ, Elga, Niemcy) i suszono w suszarce próżniowej w

solution spinning by wet or dry process. The method of spinning from the solution by the wet process avoids degradation of the polymer as in the case of the high temperature spinning from melt. The method of spinning from the solution permits to produce resorbable fibers over a wide range of the molecular weights and concentrations [8].

The aim of this study was to obtain fibers from copolymer of glycolide and L-lactide by the method of spinning from the solution by the wet process and to evaluate their mechanical properties, character of their surface (by scanning electron microscopy) and degradation kinetics (on the base of mechanical properties examination).

Materials

Glycolide and L-lactide (Purac, Holland) were purified by recrystallization from dry ethyl acetate in a vacuum dryer at a room temperature. Copolymerization of glycolide and lactide was performed in bulk with a $Zr(acac)_4$ initiator at 100°C by a conventional method using a vacuum line for degassing and sealing of the ampoules according to the method described previously [9]. The molar ratio of the initiator and the monomers was 1.2×10^{-3} . The fibers were spun from the solution by the wet process. 20% polymer solution was prepared by dissolving of PGLA into N,N-dimethyl formamide (DMF). The laboratory spinning machine, whose construction made it possible to stabilise technological parameters at a required level under continuous control was used. Spinnerettes with 240 orifices of diameter of 0,08 mm were used. The solidification process was carried out in a bath containing an aqueous solution of the solvent (20-40%) at a temperature of about 8-15°C. The drawing process was performed in a single stage, in a plastic bath containing the solvent (15-30%) at an elevated temperature up to 30-50°C. Finally, solvent was rinsed off, and the resultant fibres were dried under the isometric conditions at a low temperature.

Methods

Properties of materials

The copolymer composition was determined by 1H NMR measurements (Varian Unity Inova spectrometer). The molecular mass M_n and M_w of copolymer before and after processing in the fibers were determined by gel permeation chromatography with the Physics SP 8800 chromatograph. The diameter of PGLA fibers was measured by Lanametr using eyepiece with a micrometer scale and it was obtained by averaging the diameter of 25 individual fibres.

The microstructure of fibers was studied by JSM 5400 scanning electron microscope (JEOL, Japan) at magnification 50, 500 and 1000 times respectively. Before analysis the samples were coated with a thin carbon layer in order to make them conductive.

Degradation study

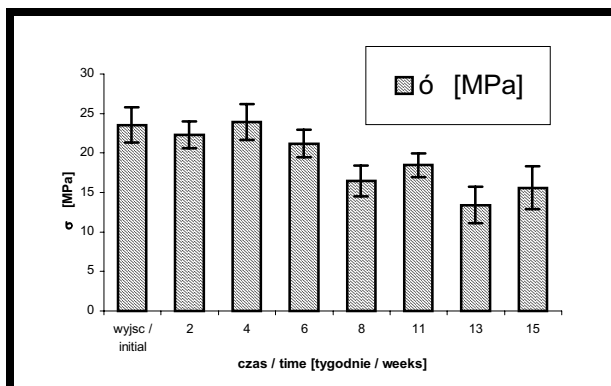
Degradation of fibers was performed in 0.9% sodium chloride solution buffered with 24mM Na_2HPO_4 and 16 mM KH_2PO_4 (PBS -solution) of pH=7.0 at 37°C. The bunches of fibers were cut into pieces of the length 8 cm and were incubated in 100ml of buffer in plastic vials for 25 weeks. The buffer was exchanged every week. After every 2 weeks two bunches were taken, washed three times in UHQ water (PureLab UHQ, Elga, Germany) and dried in a vacuum oven at 25°C for 24h. The buffer was exchanged every week. Mechanical properties of fibers: tensile strength, Young's modulus and elongation at break on 25 individual fibers from each experimental group were measured at room temperature by universal testing machine Zwick 1435 at crosshead

temperaturze 25°C. Roztwór buforowy wymieniano co tydzień.

Właściwości mechaniczne: wytrzymałość na rozciąganie, moduł Younga i odkształcenie przy zerwaniu pojedynczych włókien wyciągniętych z pęczka badano za pomocą uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej Zwick 1435 stosując szybkość rozciągania 50 mm/min i wykonując pomiary dla 25 włókien z każdej serii pomiarowej. Długość próbki (włókna) była równa 25 mm, moduł Younga mierzony był w zakresie obciążeń od 0.002 N do 0.004 N.

Wyniki i dyskusja

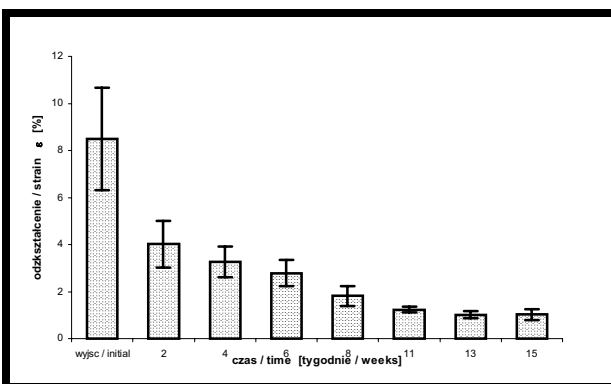
Właściwości kopolimeru i włókien



RYS. 2. Zależność wytrzymałości na włókien PGLA od czasu inkubacji w PBS.

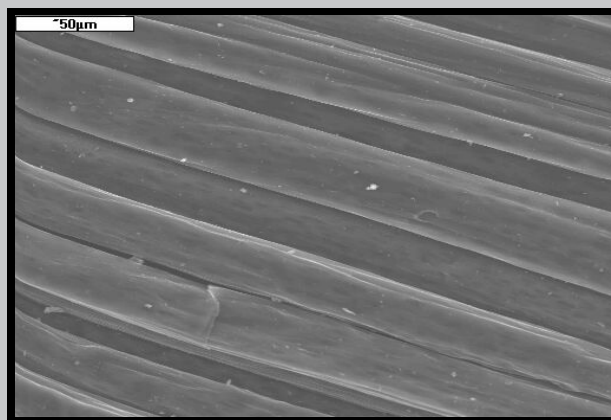
FIG. 2. Variation of tensile strength of fibers as a function of incubation time in PBS.

Analiza ^1H NMR wykazała, że stosunek molowy glikolidu do L-laktydu w kopolimerze wynosił 17:83. Badania chromatografii żelowej wykazały, że liczbowo średnia masa cząsteczkowa, M_n , kopolimeru wynosiła 85 000 D, a wagowo średnia masa cząsteczkowa była równa 161 500 D. Liczbowo średnia masa cząsteczkowa tworzywa otrzymanych włókien była równa 63 000 D, a wagowo średnia masa cząsteczkowa wynosiła 126 000 D. Stwierdzono, że operacje związane z procesem formowania włókien takie jak zestawianie w kąpeli (woda-DMF) oraz odpłukanie rozpuszczalnika spowodowały spadek masy cząsteczkowej tworzywa włókien o około 25%. Jest to związane z degradacją łańcuchów kopolimeru prawdopodobnie w wyniku hydrolizy.



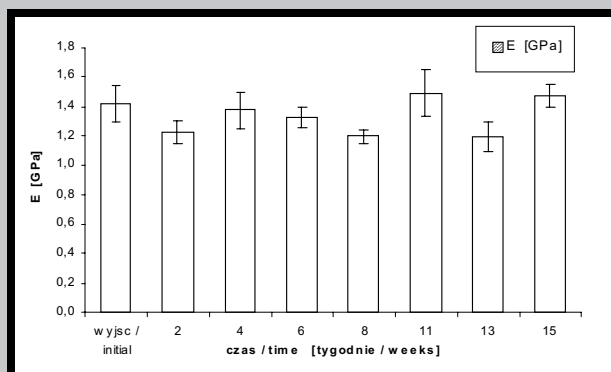
RYS. 4. Zależność odkształcenia do zniszczenia włókien od czasu inkubacji w PBS.

FIG. 4. Variation of elongation at break of fibers as a function of incubation time in PBS.



RYS. 1. Obraz włókien z PGLA (SEM, 500x).

FIG. 1. Microphotograph of PGLA fibers (SEM, 500x).



RYS. 3. Zależność modułu Younga włókien od czasu inkubacji w PBS.

FIG. 3. Variation of Young's modulus of fibers as a function of incubation time in PBS.

speed of 50 mm/min. The length of the specimen was 25 mm. The Young's modulus was estimated in the range of loading between 0.002 N and 0.004 N.

Results and discussion

Properties of copolymer and fibers

A molar ratio of glycolide to L-lactide in the copolymer PGLA was 17:83, as determined ^1H NMR. Gel permeation chromatography showed that number average molecular mass, M_n , of copolymer was 85 000 D, and weight average molecular mass, M_w , was 161 500 D. The number average molecular mass, M_n , of fibers was 63 000 D, and weight average molecular mass, M_w , was 126 000 D. It has been found that the operations connected with the fiber formation process such as solidification in a water-DMF bath and solvent washing out caused the molecular weight of polymer to decrease by about 25%. This seems to be due to the degradation of copolymer chains by hydrolysis.

FIG.1. shows microstructure of PGLA fibers obtained by scanning electron microscope (SEM). The surface of fibers is smooth, and the diameter of fibers is about 30 μm . The diameter of fibres measured by the optical microscope is also 30 ± 1 μm . The initial fibers are characterized by tensile strength of 23.5 ± 2.2 MPa, Young's modulus of 1.4 ± 0.1 GPa and elongation at break of 8.5 ± 2.2 %.

The fibres have quite weak mechanical properties, what makes them not suitable for reinforcing of the composites and preparation of load-bearing implants. However, poor mechanical properties do not exclude such fibres to be utilized as scaffolds for tissue engineering, where the most important criteria are biocompatibility, proper microstructure

RYS.1 przedstawia obraz włókien PGLA otrzymany za pomocą mikroskopu skaningowego SEM. Powierzchnia włókien jest gładka, a ich średnica wynosi około 30 μm . Średnica włókien mierzona za pomocą mikroskopu optycznego wynosiła również $30 \pm 1 \mu\text{m}$. Włókna wyjściowe miały wytrzymałość na rozciąganie równą $23.5 \pm 2.2 \text{ MPa}$, moduł Younga równy $1.4 \pm 0.1 \text{ GPa}$ i odkształcenie zniszczenia równe $8.5 \pm 2.2 \%$.

Włókna te mają słabe właściwości mechaniczne, dlatego nie nadają się do wzmacniania kompozytów i wytwarzania z nich implantów przenoszących duże obciążenia. Jednakże słabe właściwości mechaniczne nie wykluczają zastosowania tych włókien jako podłoża dla inżynierii tkankowej, gdzie najważniejsze są takie parametry jak biogodność, odpowiednia mikrostruktura i czas degradacji.

Badania degradacji

RYS.2,3 i 4 przedstawiają zależności wytrzymałości na rozciąganie, modułu Younga i odkształcenia przy zniszczeniu włókien w funkcji czasu inkubacji w PBS. Włókna przetrzymywano w PBS przez 25 tygodni, ale już po inkubacji przez 15 tygodni włókna stawały się do tego stopnia słabe i kruche, że nie było możliwe przeprowadzenie badań mechanicznych. Wytrzymałość na rozciąganie i odkształcenie zniszczenia spadały w funkcji czasu inkubacji w PBS, podczas gdy moduł Younga nie ulegał wyraźnym zmianom. W funkcji czasu inkubacji w PBS włókna stawały się słabe i kruche ale nie zmieniała się ich średnica. To sugeruje, że tworzywo włókien ulegało degradacji w masie w wyniku reakcji hydrolizy.

Wnioski

1. Zastosowanie metody formowania z roztworu na mokro przy użyciu jako rozpuszczalnika DMF umożliwia uzyskanie włókien z kopolimeru glikolidu z L-laktydem. Z etapami procesu formowania włókien (zestalenie, usuwanie rozpuszczalnika) związane jest obniżenie masy cząsteczkowej tworzywa włókien do około 75% wartości początkowej kopolimeru po syntezie.

2. Inkubacja w czasie 15 tygodni w PBS powoduje utratę właściwości wytrzymałościowych z zachowaniem postaci włókien przez 25 tygodni.

Podziękowania

Praca finansowana ze środków budżetowych na naukę w roku 2005 (projekt nr 082/T08/2002)

and adequate degradation profile.

Degradation study

FIGs.2, 3 and 4 present variations of tensile strength, Young's modulus and elongation at break of fibers as a function of incubation time in PBS. The fibres were incubated in PBS for 25 weeks, but after immersion time longer than 15 weeks, the fibres were so fragile, that it was impossible to perform mechanical tests. Tensile strength and elongation at break of fibers decrease during incubation in PBS, while Young's modulus remains constant. During incubation in PBS the fibres become weak and fragile but their diameter do not change. It suggests that the fibres degrade through hydrolysis in bulk.

Conclusions

1. The use of the wet process of fiber forming from solution using DMF as solvent makes it possible to obtain fibers from the copolymer of glycolide and L-lactide. The stages of fiber forming such as solidification and solvent removal bring about a decrease in the molecular weight of the fiber-forming polymer to about 75% of the initial value of the polymer after its synthesis.

2. The incubation for a period of 15 weeks in PBS results in the loss of mechanical properties, while the fibers maintain their form for 25 weeks.

Acknowledgement

This work was financed from the Polish Budget Funds for Scientific Research within the year 2005 (project No 082/T08/2002).

Piśmiennictwo

References

- [1] J.R. Fuchs, B.A. Nasser, J.P. Vacanti, Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction, *Ann Thorac Surg* 72 (2001) 577-91.
- [2] G. Mikos, J. S. Temenoff: "Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering", *Biotechnology of Human Disorders* 3 (2000), 1-7
- [3] L. A. Smith, P. X. Ma "Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 39 (2004), 125 - 131
- [4] X. Zong, S. Ran, D. Fang, B. S. Hsiao, B. Chu "Control of structure, morphology and property in electrospun poly(glycolide-co-lactide) non-woven membranes via post-draw treatments", *Polymer* 44 (2003), 4959-4967
- [5] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, B. Chu "Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes", *Polymer* 43 (2002), 4403-4412.
- [6] K. Kim, M. Yu, X. Zong, J. Chiu, D. Fang, Y. Seo, B. S. Hsiao, B. Chu, M. Hadjiargyrou "Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(D,L-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical application", *Biomaterials* 24 (2003), 4977- 4985
- [7] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna "Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering", *Biomaterials* 26 (2005), 2603-2610
- [8] S. Gogolewski, A. J. Pennings "Resorbable materials of poly(L-lactide). II. Fibers spun from solution of poly(L-lactide) in good solvents" *Journal of Applied Polymer Science* 28 (1983), 1045- 1061
- [9] P. Dobrzyński, J. Kasperczyk, H. Janeczek, M. Bero "Synthesis of biodegradable copolymers with the use of low toxic zirconium compounds. 1. Copolymerization of glycolide with L-lactide initiated by $\text{Zr}(\text{acac})_4$ ", *Macromolecules* 34 (2001), 5090-5098.

BIOCERAMIKA Z PREKURSORÓW POLIMEROWYCH JAKO SUBSTYTUT TKANKI KOSTNEJ

TERESA GUMUŁA, JOANNA PODPORSKA, MARTA BŁĄŻEWICZ

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA
TGUMULA@UCI.AGH.EDU.PL

Streszczenie

Celem pracy było opracowanie metody wytwarzania bioaktywnego materiału implantacyjnego przeznaczonego dla chirurgii kostnej. Bioceramiczne tworzywo otrzymano drogą obróbki termicznej prekursora krzemoorganicznego, zawierającego aktywne dodatki.

Skład fazowy materiału ceramicznego badano za pomocą spektroskopii w podczerwieni (FTIR) oraz dyfrakcji rentgenowskiej (XRD). Mikrostrukturę otrzymanego materiału analizowano za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) połączonej z mikroanalizą rentgenowską (EDS). Przeprowadzono test bioaktywności w warunkach "in vitro" poprzez przetrzymywanie materiałów ceramicznych w SBF-ie.

Badania wykazały, że obróbka termiczna prekursora krzemoorganicznego zawierającego aktywne wypełniacze prowadzić może do otrzymania tworzywa ceramicznego zawierającego wolastonit, charakteryzującego się bioaktywnością w warunkach "in vitro".

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),85-87]

Wstęp

Wiele materiałów jest obecnie badanych w kierunku wykorzystania jako substytut tkanki kostnej. Ważną grupę materiałową stanowi tzw. powierzchniowo aktywna lub bioaktywna ceramika, do której zalicza się gęste, syntetyczny hydroksyapatyt, bioszkła, tworzywa szkło-krystaliczne jak również kompozyty na bazie tych materiałów [1-4].

Bioaktywne apatytowo-wolastonitowe tworzywa szkło-krystaliczne bazują na układzie CaO-SiO_2 . Klasyczne materiały tego typu wytwarza się drogą topienia mieszanki odpowiednich surowców chemicznych i mineralnych, a następnie prowadzi się kontrolowaną krystalizację szkła. Temperatury topienia w tej metodzie wynoszą zwykle ok. 1500°C [1-4]. Głównymi wadami tej metody są wieloetapowość procesu otrzymywania gotowych wyrobów (topienie, melenie produktów, formowanie, spiekanie) oraz wysokie temperatury otrzymywania wyrobów.

Obok klasycznej metody topienia rozwinęła się chemiczna metoda otrzymywania materiałów zawierających wolastonit, mianowicie metoda zol-żel. W metodzie tej podstawowe składniki szkła wprowadza się w postaci organicznych związków odpowiednich pierwiastków [3,5]. W porównaniu do klasycznej metody topienia, w metodzie zol-żel temperatury obróbki termicznej nie przekraczają 1200°C, jednakże jest to metoda kosztowna, mało wydajna i nie pozwala na otrzymywanie wyrobów o skomplikowanych kształtach. Nowym i bardzo obiecującym sposobem, który może prowadzić do otrzymania ceramiki wolastonitowej, jest kontrolowana obróbka termiczna polimerów krzemoorganicznych zawierających odpowiednio dobrane aktywne wypełniacze

BIOCERAMICS OBTAINED FROM POLYMER PRECURSORS AS A BONE TISSUE SUBSTITUTE

85

TERESA GUMUŁA, JOANNA PODPORSKA, MARTA BŁĄŻEWICZ

AGH-UST, UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND
TGUMULA@UCI.AGH.EDU.PL

Abstract

The aim of this work was to elaborate the preparation method of bioactive implant material for bone surgery applications. The bioceramic material was obtained by thermal treatment of active fillers-containing organosilicon precursor.

The phase composition of ceramic material was analysed by means of infrared spectroscopy (FTIR) and XRD analysis (XRD). The microstructure of the obtained material was studied by scanning electron microscopy (SEM) with EDS point analysis. The bioactivity test in "in vitro" conditions was determined by immersing of ceramic samples in SBF.

It was found that thermal treatment of active fillers-containing organosilicon precursor leads to formation of wollastonite-containing ceramic material. The ceramic material demonstrates bioactivity in "in vitro" conditions.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),85-87]

Introduction

A number of materials have been investigated as substitute parts of hard tissues like bones. An important group of these materials consists of the so-called surface reactive or bioactive ceramics, such as dense synthetic hydroxyapatite, bioglasses, glass-ceramics and composites basing on these materials [1-4].

Bioactive apatite/wollastonite glass-ceramics materials base on elementary CaO-SiO_2 system. The typical method applied for producing wollastonite-containing materials is melting of the mixture of suitable raw chemicals followed by controlled crystallization of the glasses. The melting temperature in this method is usually about 1500°C [1-4]. The main drawbacks of this method are multistep preparation procedure (melting, grinding, forming and sintering) and relatively high processing temperatures.

The second way leading to obtaining wollastonite-containing materials is the chemical method called sol-gel. In this method glass components are introduced as organic compounds of suitable elements [3,5]. In comparison with melting method, the temperatures in sol-gel method do not exceed 1200°C. However, the sol-gel method is expensive, has low efficiency and do not allow to obtain complex shapes.

The new and very promising way that could be applied for obtaining wollastonite-containing ceramics is controlled heat treatment of silicon-containing polymer precursor with suitable ceramic active fillers. Heat treatment of such mixtures, depending from the type of polymer precursor, type of active fillers and final heat treatment temperature, leads to formation of wollastonite-containing ceramic material already

ceramiczne. Obróbka termiczna takiej mieszaniny, w zależności od rodzaju prekursora polimerowego, rodzaju aktywnych wypełniaczy i temperatury obróbki termicznej, prowadzi do otrzymania materiału ceramicznego zawierającego wolastonit już w temperaturze 1000°C. Metoda ta jest stosunkowo tania, wydajna i pozwala na otrzymywanie wyrobów o skomplikowanych kształtach.

Celem pracy było opracowanie nowego sposobu otrzymywania materiału ceramicznego zawierającego wolastonit, który otrzymywano drogą obróbki termicznej polimeru polysiloksanowego zawierającego aktywne dodatki.

Materiały i metody

Do otrzymania próbek wykorzystano żywicę polimetylofenylosiloksanową Lukosil 901 (Lucebni Zawody, Kolin, Republika Czeska) oraz aktywne dodatki (amorficzną krzemionkę, wodorotlenek wapnia).

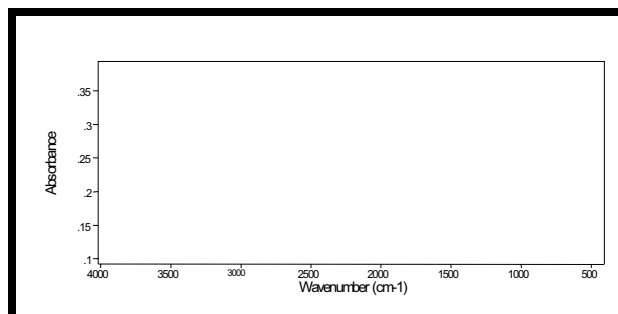
Sporządzano mieszaniny żywicy i aktywnych dodatków, które sieciowano przez 6 dni w temperaturze 100-150°C. Następnie usieciowane próbki mielono. Z tak otrzymanych proszków formowano pastylki, które poddawano obróbce termicznej w temperaturze 1000°C ze średnią szybkością ogrzewania wynoszącą 0,7°C/min (24-godzinny całkowity czas ogrzewania).

Badania ceramicznych produktów obróbki termicznej prowadzono za pomocą spektroskopii w zakresie środkowej podczerwieni, mianowicie od 4000-400 cm⁻¹, metodą absorpcyjną, przy użyciu spektrofotometru FTS - 60 V Bio Rad. Badania struktury otrzymanych próbek zostały wykonane za pomocą dyfraktometru rentgenowskiego (K_α, lampa Cu, filtr Ni). Badania mikrostruktury przeprowadzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego JMS-5400 firmy JEOL, współpracującego z mikroanalizatorem dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (EDS) LINK AN 10000.

Bioaktywność próbek ceramicznych określano w warunkach "in vitro" poprzez przetrzymywanie materiałów ceramicznych w sztucznym osoczu (SBF) przez 4 tygodnie. Po tym okresie prowadzono obserwacje mikroskopowe i wykonywano mikroanalizę rentgenowską powierzchni próbek.

Wyniki badań

RYS.1 przedstawia widmo FTIR dla badanej próbki ceramicznej. Widmo FTIR próbki ceramicznej zawiera pasma związane z drganiami wiązań Si-O-Si w zakresie liczb falowych 1200-1000 cm⁻¹ (drżania rozciągające asymetryczne), 850-600 cm⁻¹ (drżania rozciągające symetryczne) oraz przy około 500 cm⁻¹ (drżania zginające). W widmie widoczne są pasma pochodzące od drgań charakterystycznych



RYS. 1. Widmo FTIR dla próbki z 1000°C.
FIG. 1. FTIR spectrum of sample obtained at 1000°C.

at about 1000°C. This is a relatively inexpensive and efficient method and enables to obtain complex shapes. The aim of this work was to elaborate preparation method of wollastonite-containing ceramic material by heat treatment of active fillers-containing polysiloxane polymer.

Materials and methods

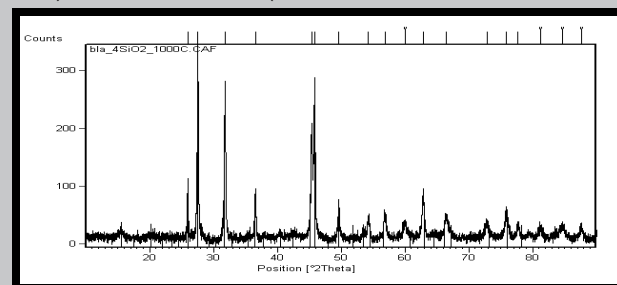
Lukosil 901 polymethylphenylsiloxane resin (Lucebni Zawody, Kolin, Czech Republic) and active fillers (amorphous silica and calcium hydroxide) were used. The resin and active fillers were mixed and cured during the time of 6 days in the range from 100 to 150°C. The cured samples were ground. Then, from as received powders pellets were formed and heat treated at 1000°C in an inert atmosphere at the mean heating rate of 0,7°C/min (total time of heating - 24 hour).

The study on heat treatment product was led by means of infrared absorption spectroscopy in the range from 4000 to 400 cm⁻¹ on FTS-60 V Bio Rad spectrometer. The structure of ceramic samples was carried out on XRD diffractometer (Cu K_α radiation, Ni-filtered). Microstructure of the materials was examined by scanning electron microscopy JEOL 5400 with LINK AN 10000 point microanalyzer of X-ray radiation.

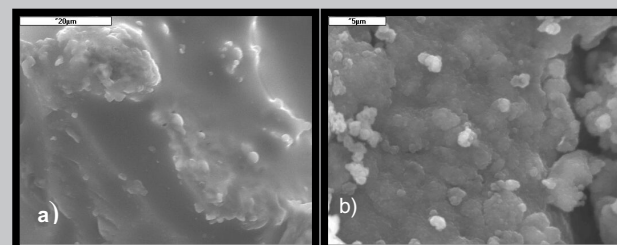
In order to study in vitro bioactivity the ceramic sample was soaked in simulated body fluid (SBF) during the time of 4 weeks. After this period of time the surface of the ceramic samples was studied by SEM and EDS analysis.

Results

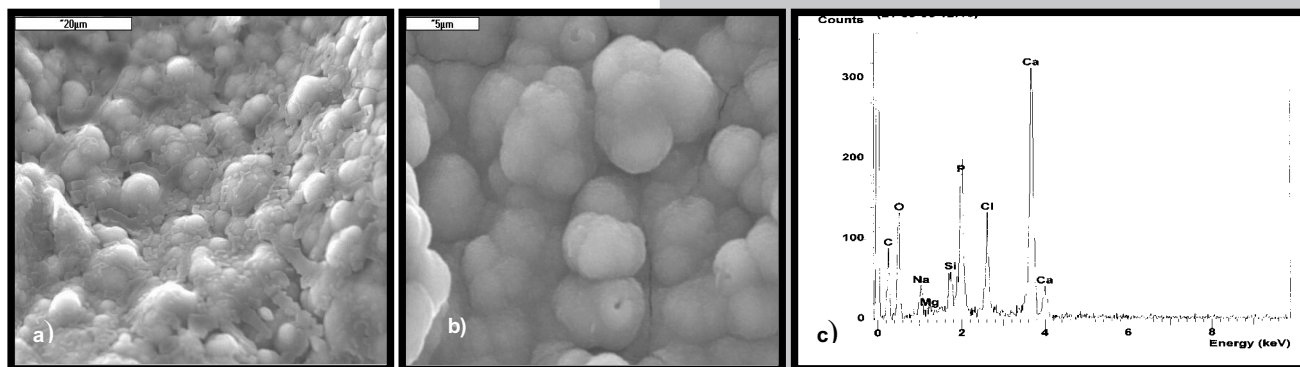
FIG.1 show FTIR spectrum of ceramic sample. FTIR spectrum of the sample show bands originating from Si-O-Si bonds: 1200-1000 cm⁻¹ (asymmetric stretching vibrations), 850-600 cm⁻¹ (symmetric stretching vibrations) and about 500 cm⁻¹ (bending vibrations). Also, it can be seen bands associated with the presence of α- cristoballite (1210 cm⁻¹, 797 cm⁻¹) and α-wollastonite (432 cm⁻¹, 563 cm⁻¹, 716 cm⁻¹, 923



RYS. 2. Dyfraktogram próbki ceramicznej.
FIG. 2. XRD pattern of ceramic sample.



RYS. 3. Mikrofotografie próbki zawierającej wolastonit; a) (SEM, 2000x), b) (SEM, 5000x).
FIG. 3. Micrographs of wollastonite-containing sample; a) (SEM, 2000x), b) (SEM, 5000x).



RYS. 4. Mikrofotografie uzyskane za pomocą SEM próbki zawierającej wolastonit - próbka po przetrzymywaniu w SBF-ie; a - powiększenie 2000x, b) powiększenie 5000x, c) EDS.

FIG. 4. SEM micrographs of wollastonite-containing sample after incubation in SBF; a) magnification 2000x, b) magnification 5000x, c) EDS analysis.

dla α -krystobalitu (1210 cm^{-1} , 797 cm^{-1}) oraz dla α -wollastonitu (432 cm^{-1} , 563 cm^{-1} , 716 cm^{-1} , 923 cm^{-1} , 939 cm^{-1} , 988 cm^{-1} , 1072 cm^{-1} , 1079 cm^{-1}).

RYS.2 przedstawia dyfraktogram próbki obrabianej cieplnie w temperaturze 1000°C . Analiza rentgenowska wykazała, że ceramiczny produkt obróbki termicznej krzemooorganicznego prekursora z aktywnymi wypełniaczami zawiera wolastonit (CaSiO_3). Rozmiar krystalitów wolastonitu, obliczony z dyfraktogramu na podstawie równania Scherrer'a, wynosi ok. 55 nm.

RYS.3 i 4 przedstawiają mikrofotografie oraz analizę EDS próbek przed i po teście bioaktywności. Z porównania obrazów mikroskopowych wynika, że na próbce przetrzymywanej w SBF-ie wyraźnie widoczne są "kafiorowate" wytrącenia - na powierzchni ceramicznej próbki wykrył się fosforan wapnia.

Podsumowanie

Uzyskane wyniki wskazują, że obróbka termiczna prekursora polisiloksanowego zawierającego aktywne dodatki stanowić może alternatywną metodę otrzymywania bioaktywnych, wolastonitowych materiałów.

Podziękowania

Praca finansowana przez Akademię Górniczo-Hutniczą - badania statutowe nr. 11.11.160.116.

cm^{-1} , 939 cm^{-1} , 988 cm^{-1} , 1072 cm^{-1} , 1079 cm^{-1}).

FIG. 2 show diffraction pattern of the sample heat treated at 1000°C . XRD analysis reveals that heat treatment product of the active fillers-containing organosilicon precursor contains wollastonite (CaSiO_3). The crystallite size of wollastonite, calculated from diffraction peak using the Scherrer formula, is about 55 nm.

FIGs.3 and 4 show microphotographs and EDS analysis of the samples before and after the bioactivity test. As it results from the comparison of the micrographs, onto the sample after incubation in SBF the so-called "cauliflowers" morphology can be clearly observed - onto the surface of ceramic samples calcium phosphate precipitates.

Summary

The results presented in this work indicate that heat treatment of active fillers-containing polysiloxane precursor offers the alternative method for receiving of bioactive wollastonite material.

Acknowledgements

This work was supported by The AGH-University of Science and Technology - statute investigations No. 11.11.160.116.

Piśmiennictwo

References

- [1] Hench L.L. Bioactive materials: The potential for tissue regeneration, J Biomed Mater Research 41, 1998, 511-518.
- [2] Kokubo T., A/W glass-ceramic: processing and properties, in: L.L. Hench, J. Wilson (Eds.), An Introduction to Bioceramics, World Scientific, Singapore, 1993, 75-88.
- [3] Błażewicz S., Stoch L., Biomateriały, Tom VI edycji Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna 2000, Warszawa 2003.
- [4] Hench L. L., Ethridge E., Biomaterials. An interfacial approach, Academic Press, New York, 1975.
- [5] Li P., Kokubo T., Nakanishi K., Soga N., de Grot K., Induction and morphology of hydroxyapatite, precipitated from metastable simulated body fluids, on sol-gel prepared silica, Biomaterials 14, 1993, 963-968.

WPŁYW DODATKÓW MODYFIKUJĄCYCH NA WŁAŚCIWOŚCI POLI(LAKTYDO-KO-GLIKOLIDU) W WARUNKACH IN VITRO

PATRYCJA ROSÓŁ*, JAN CHŁOPEK*, KINGA PIELICHOWSKA**, JAN PIELICHOWSKI**, DANUTA MULICA*

*AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLSKA

**POLITECHNIKA KRAKOWSKA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII I TECHNOLOGII CHEMICZNEJ,
SAMODZIELNA KATEDRA CHEMII I TECHNOLOGII TWORZYW
SZTUCZNYCH, UL. WARSZAWSKA 24, 31-155 KRAKÓW

Streszczenie

W przedstawionej pracy badano wpływ dodatków modyfikujących na właściwości termiczne oraz mechaniczne kopolimeru laktydu z glikolidem w warunkach in vitro. Jako fazy modyfikujące zastosowano włókna węglowe krótkie, nanocząstki hydroksyapatytu pochodzenia naturalnego (z kości zwierzęcych) oraz bioszkieło. Badania mechaniczne przeprowadzono dla materiałów wyjściowych oraz po 4 i 8 tygodniach inkubacji. Dodatkowo dla oceny postępu degradacji badanych materiałów w warunkach in vitro przeprowadzono obserwacje ich powierzchni za pomocą mikroskopu skaningowego.

Jak zaobserwowano, dodatek włókien węglowych najbardziej ze wszystkich modyfikujących faz powiększył wytrzymałość PGLA w stosunku do wytrzymałości wyjściowej. Jednocześnie obserwowano wcześniejszą degradację kompozytu z włóknem węglowym w porównaniu do czystego polimeru i duże osłabienie właściwości mechanicznych w warunkach in vitro. Zastosowanie jako fazy modyfikującej bioszkieła i hydroksyapatytu również poprawiło właściwości mechaniczne czystego PGLA. Ponadto właściwości mechaniczne kompozytu PGLA/Bioszkieło były najbardziej stabilne w warunkach in vitro w porównaniu do innych materiałów, a obecność bioaktywnych cząstek wywierała korzystny wpływ na zachowanie biologiczne kompozytu PGLA/HA, co potwierdziły obserwacje SEM próbek inkubowanych w sztucznym środowisku biologicznym.

Słowa kluczowe: polimery resorbowalne, kompozyty, warunki in vitro, implanty, badania DSC
[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),88-92]

Wstęp

Złożona budowa ludzkiego ciała, niejednorodność właściwości mechanicznych tkanek, a także obronne reakcje organizmu na wszczepione materiały powodują konieczność ciągłego udoskonalania implantów. Najkorzystniejsze wydaje się podpatrywanie natury i wytwarzanie materiałów naśladujących zarówno budowę chemiczną jak i strukturę naturalnych tkanek. Grupą materiałów, która wykazuje duże podobieństwo do tkanki kostnej są kompozyty polimerowe modyfikowane fazą ceramiczną [1-3]. W zależności od rodzaju, ilości i sposobu rozmieszczenia tych faz w osnowie, można otrzymać materiały o różnorodnych właściwościach

THE EFFECT OF MODIFYING PHASES ON PROPERTIES OF POLI(LACTIDO-CO-GLYCOLIDE) AT IN VITRO CONDITIONS

PATRYCJA ROSÓŁ*, JAN CHŁOPEK*, KINGA PIELICHOWSKA**, JAN PIELICHOWSKI**, DANUTA MULICA*

*AGH-UST, UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW, POLAND

**CRACOW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY,
DEPARTMENT OF CHEMISTRY AND POLYMER TECHNOLOGY,
WARSZAWSKA ST. 24, 31-155 KRAKÓW, POLAND

Abstract

In this work the effects of modifying phases on thermal and mechanical properties of lactide and glycolide co-polymer have been examined under 'in vitro' conditions. Short carbon fibres, hydroxyapatite nano-particles of natural origin (animal bones) and bioglass, have been used as modifying phases. Mechanical properties' tests were carried out on initial materials after 4 and 8 weeks of incubation. Additionally, in order to evaluate the progress of degradation of examined materials under 'in vitro' conditions, observations of their surfaces using the SEM were performed.

It has been noted that the addition of carbon fibres is the most efficient from all modifying phases in terms of PGLA strength increase, as compared to initial strength. At the same time, faster degradation of carbon fibre composite has been observed compared to pure polymer, and significant decrease of mechanical properties under 'in vitro' conditions. The use of bioglass and hydroxyapatite as modifying phases improved mechanical properties of pure PGLA. Mechanical properties of PGLA/bioglass composite were the most stable under 'in vitro' conditions, as compared to other materials. The presence of bioactive particles showed beneficial effect on biological behaviour of PGLA/HA composite, what was confirmed by SEM observations of samples incubated in artificial biological environment.

Key words: resorbable polymers, composites, in vitro conditions, implants, DSC studies
[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),88-92]

Introduction

The complexity of human body, ununiform mechanical properties of various tissues, as well as defensive reactions of the body to implanted materials, cause the necessity of continuous work on implants improvement. Copying the nature and fabrication of materials simulating both chemical composition and the structure of natural tissues seems to be the most beneficial approach. Polymer composites modified with ceramic phases are the group of materials which show substantial similarity to bone tissue [1-3]. Depending on type, quantity and spatial distribution of these phases in the matrix, materials with different mechanical and biological properties can be obtained. Composites made

mechanicznych i biologicznych. Szczególnie interesujące wydają się kompozyty z polimerów bioresorbowalnych [4-6]. Ich zaletą jest możliwość uniknięcia powtórnej operacji w celu usunięcia implantu. Ponadto zastosowanie takich kompozytów prowadzi do powstania implantów wielofunkcyjnych, w których po spełnieniu funkcji biomechanicznej, po procesie resorpcji, faza wzmacniająca może pełnić rolę rusztowania dla wzrostu tkanki kostnej.

W przedstawionej pracy badano wpływ dodatków modyfikujących na właściwości termiczne oraz mechaniczne kopolimeru laktydu z glikolidem w warunkach *in vitro*. Jako fazy modyfikujące zastosowano włókna węglowe krótkie, nanocząstki hydroksyapatytu pochodzenia naturalnego (z kości zwierzęcych) oraz bioszko. Badania mechaniczne przeprowadzono dla materiałów wyjściowych oraz po 4 i 8 tygodniach inkubacji. Dodatkowo dla oceny postępu degradacji PLGA w warunkach *in vitro* i wpływu na jej wielkość faz modyfikujących przeprowadzono obserwacje powierzchni próbek za pomocą mikroskopu skaningowego.

Materiały i metody

Badania przeprowadzono na kształtkach w formie wioselek otrzymanych metodą wtrysku w temperaturze 175°C wykonanych z poli(laktydo-ko-glikolidu) (PGLA), PLA:PGA - 84:16, Mn=92000, wytworzonego w Centrum Chemii Polimerów PAN w Zabrzu [7]. Do modyfikacji PGLA użyto:

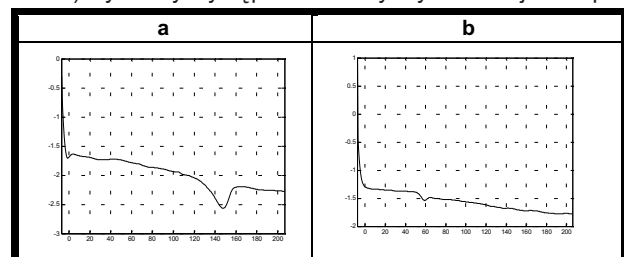
a) włókien węglowych krótkich FT 300 Torayca, $d=1.76 \text{ g/cm}^3$, $\sigma_f=3530 \text{ MPa}$, $E=230 \text{ GPa}$; 2. nanocząstek hydroksyapatytu $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) pochodzenia naturalnego (z kości wieprzowej) w ilości 10% mas., $d=3.16 \text{ g/cm}^3$, $S_w=71.4 \text{ m}^2/\text{g}$, otrzymanego w Katedrze Ceramiki Specjalnej AGH w Krakowie [8]; 3. bioszko o symbolu S2 o składzie chemicznym: 80%mol. SiO_2 , 16%mol CaO , 4%mol P_2O_5 otrzymanego metodą zol-żel w Katedrze Technologii Szkła i Powłok Amorficznych AGH w Krakowie; $d=2,4037 \text{ g/cm}^3$, $S_w=297,9663 \text{ m}^2/\text{g}$ [9].

Do symulacji środowiska biologicznego użyto płynu Ringera produkcji Baxter Terpol Sp. z o.o. o następującym składzie $[\text{g/dm}^3]$: NaCl-8.60; KCl-0.30; CaCl_2 -0.48.

Badanie DSC przeprowadzono za pomocą aparatu Netzsch DSC 200. Pomiary w zakresie temperatur 0-200°C były prowadzone przy szybkości ogrzewania 10K/min. Odbływały się one w atmosferze argonu. Pomiary właściwości mechanicznych przeprowadzono za pomocą uniwersalnej maszyny wytrzymałościowej Zwick 1435. Zmiany zachodzące na powierzchni próbek inkubowanych w symulowanym środowisku biologicznym po okresie 4 i 8 tygodni obserwowano przy pomocy mikroskopu skaningowego Jeol JSM-5400 z mikroanalizatorem rentgenowskim LINK ISIS Seria 300.

Omówienie wyników

Wyniki badań DSC dla wyjściowego poli(laktydo-ko-glikolidu) wykazały występowanie fazy krystalicznej o tempe-



RYŚ. 1. Analizy DSC dla: kompozytu PGLA:

a - próbka wyjściowa, b - po wtrysku.

FIG. 1. The DSC analyses for PGLA composite:

a - initial sample, b - after injection.

of biosorbable polymers seem to be particularly interesting [4-6]. The opportunity to avoid repeated surgery in order to remove the implant is their major advantage. Additionally, the application of such composites leads to formation of multifunctional implants, in which after fulfilling the mechanical function and after the process of resorption, the reinforcing phase may play a role of scaffolding helping the growth of bone tissue.

In the present study the effects of modifying agents on thermal and mechanical properties of lactide-glycol co-polymer under *in vitro* conditions have been examined. Short carbon fibres, nano-particles of natural origine (animal bone) hydroxyapatite, as well as bioglass. Mechanical properties were examined on initial materials and after 4 and 8 weeks of incubation. Additionally, the SEM observations of sample surfaces were performed in order to evaluate the PLGA degradation progress under *in vitro* conditions and the effects of modifying phases on its extent.

Materials and methods

The experiments were carried out on paddle-shaped samples obtained by injection at the temperature of 175°C from poly(lactide-co-glycolide), shortly PGLA. The PLA/PGA ratio was 84:16, and the Mn=92000. Materials were prepared at the Centre for Polymer Chemistry in Zabrze, Poland [7]. The PGLA was modified with use of:

a) short carbon fibres FT 300 Torayca, $d=1.76 \text{ g/cm}^3$, $\sigma_f=3530 \text{ MPa}$, $E=230 \text{ GPa}$;

b) hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (shortly HA) nano-particles of natural origin (pig bone), in the amount of 10 mass%, $d=3.16 \text{ g/cm}^3$, $S_w=71.4 \text{ m}^2/\text{g}$, prepared by the Chair of Special Ceramics, AGH Krakow, Poland [8];

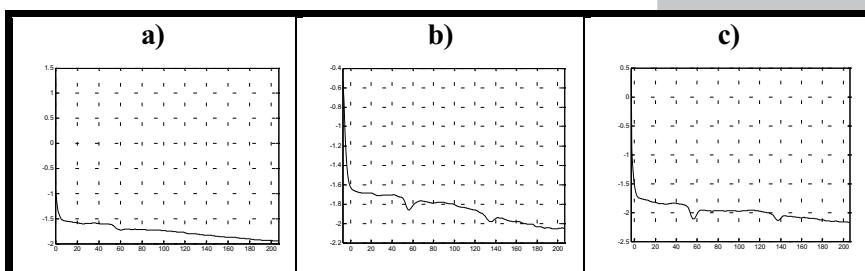
c) bioglass S2 (comp. 80%mol. SiO_2 , 16%mol CaO , 4%mol P_2O_5) made by sol-gel technique at the Chair of Glass Technology and Amorphous Coatings, AGH Krakow, Poland, $d=2,4037 \text{ g/cm}^3$, $S_w=297,9663 \text{ m}^2/\text{g}$ [9].

For simulation of biological environment the Ringer fluid was used, made by Baxter Terpol Sp. z o.o., of the following composition $[\text{g/dm}^3]$: NaCl-8.60; KCl-0.30; CaCl_2 -0.48. The DSC tests were performed in argon atmosphere using Netzsch DSC 200 apparatus within the temperature range 0-200°C and with heating speed 10K/min. Mechanical properties were examined using universal testing machine Zwick 1435. Surface changes of samples incubated in the simulated biological environment after 4 and 8 weeks were observed using Jeol JSM 5400, equipped with X-ray microanalyser LINK ISIS series 300.

Result and discussion

The results of DSC tests for basic poly(lactido-co-glycol) showed the presence of crystalline phase with melting temperature of 147.8°C and fusion heat of 52.8 J/g. The glass transition was not observed (FIG.1a) within the examined temperature range. However, the DSC results for the sample of the same polymer after injection show the loss of crystalline phase; the peak characteristic for melting crystalline areas within the temperature range 120-150°C is missing. Glass transition was observed at the temperature of 54°C, accompanied by endothermic peak resulting from enthalpy relaxation occurring during storage of amorphous material at the temperature slightly below the vitrification range (FIG.1b).

For PGLA sample with bioglass addition, the glass transition temperature was observed only at the temperature of 55°C (FIG.2a), which confirms its amorphous structure. On the other hand in PGLA samples with carbon fibre (FIG.2b)



RYS. 2. Analizy DSC dla kompozytów: a - PGLA/Bioszkło, b - PGLA/CF, c - PGLA/HA.

FIG. 2. The DSC analyses for composites: a - PGLA/bioglass, b - PGLA/CF, c - PGLA/HA.

Materiał / Material	σ_z [MPa]	E [GPa]
PLGA	22.0±5.3	4.1±0.5
PLGA/HA	31.2±1.3	4.2±0.6
PLGA / Bioszkło (PLGA / Bioglass)	37.3±3.5	4.3±0.2
PLGA/CF	70.6±9.2	14.1±0.6

TABELA 1 Wytrzymałość na zginanie oraz moduły Younga badanych materiałów.

TABLE 1. Bending strengths and Young moduli of the examined materials.

raturze topnienia 147.8°C, a ciepło topnienia badanej próbki wyniosło 52.8 J/g. W badanym obszarze temperatur nie zaobserwowano przejścia szklistego (RYS.1a). Natomiast wyniki badań DSC dla próbki tego samego polimeru po wtrysku wskazują na zanik fazy krystalicznej - brak jest piku pochodzącego od topnienia obszarów krystalicznych w zakresie temperatur 120-150°C. Zaobserwowano również przejście szkliste w temperaturze 54°C z towarzyszącym mu pikiem endotermicznym, będącym wynikiem relaksacji entalpii zachodzącej w czasie przechowywania materiału amorficznego w temperaturze nieco niższej od temperatury rejonu zeszklenia (RYS. 1b).

Dla próbki PGLA z dodatkiem bioszklą zaobserwowano jedynie przejście szkliste w temperaturze 55°C (RYS.2a), co świadczy o jego amorficznej budowie. Natomiast dla próbek PGLA z dodatkiem włókna węglowego (RYS.2b) i hydroksyapatytu (RYS.2c) zaobserwowano niewielkie piki pochodzące od topnienia obszarów krystalicznych w temperaturach odpowiednio 135°C i 137°C, jednak wyznaczone ciepła topnienia świadczą o małej zawartości fazy krystalicznej w badanych próbkach. Można zatem wnioskować, że włókna węglowe i hydroksyapatyt pełnią w tych układach rolę nukleantów krystalizacji. Dla obu próbek zaobserwowano jednocześnie przejście szkliste w zakresie temperatur zbliżonym próbek czystego PGLA po wtrysku i PGLA z dodatkiem bioszklą z wyraźnie widocznym endotermicznym pikiem będącym wynikiem relaksacji entalpii.

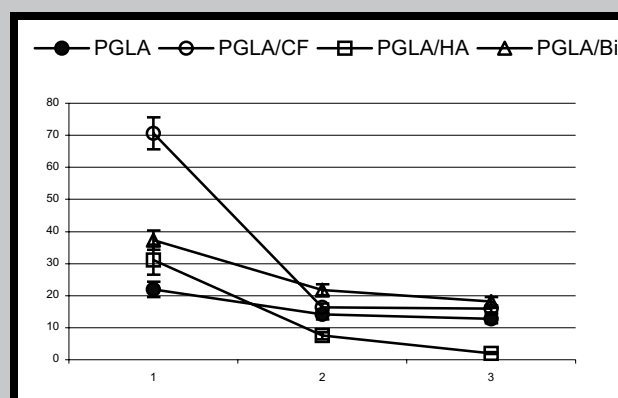
TABELA 1 zawiera wyniki badań wytrzymałości na zginanie oraz wartości modułów Younga dla czystego PLGA i jego kompozytów. Wszystkie fazy modyfikujące spowodowały wzrost wartości wytrzymałości na zginanie. Dodatek włókien węglowych charakteryzujących się doskonałymi właściwościami mechanicznymi zwiększył wartość wytrzymałości aż o 200% w stosunku do wytrzymałości wyjściowej czystego polimeru. W przypadku bioszklą zaobserwowano 70% wzrost, a dodatek hydroksyapatytu spowodował 40% wzrost wartości wytrzymałości na zginanie. W innych pracach także zauważono poprawę właściwości mechanicznych po dodaniu nanocząstek do matrycy polimerowej [10]. W przypadku modułów Younga największy wzrost wartości zaobserwowano również przypadku kompozytu PLGA/CF, natomiast pozostałe dodatki nie spowodowały istotnych zmian.

Czysty PLGA i próbki kompozytowe inkubowano w płynie Ringera o temperaturze 37°C przez okres 4 i 8 tygodni. Po tym okresie czasu badano zmianę ich właściwości mechanicznych oraz przeprowadzono obserwację powierzchni próbek za pomocą mikroskopu skaningowego. Jak wynika

and hydroxypapatite (FIG.2c) additions, small peaks were observed from melting of crystalline areas at the temperatures 135°C i 137°C, respectively. The values of fusion heats determined confirm small amounts of crystalline phases within the examined samples. It may be suggested therefore, that carbon fibres and hydroxypapatite particles perform a function of crystallization nuclei in these systems. For both samples the glass transition was observed similarly within the temperature range close to samples of pure PGLA after injection and PGLA with bioglass addition with visible endothermic peak resulting from enthalpy relaxation. TABLE 1 shows the results of bending strength tests and the values of Young moduli for pure PLGA and its composites. The presence of all modifying phases caused the increase of bending strength. The addition of carbon fibres, characterised by excellent mechanical properties, increased the value of bending strength by 200%, compared to initial strength of pure polymer. In the case of bioglass 70% increase was observed, while the addition of hydroxypapatite gave 40% increase of bending strength. Other published works also indicate improvement of mechanical properties after addition of nanoparticles to polymer matrix [10]. In the cases of Young moduli, the largest increase was also observed for PLGA/CF composite, while other additions did not introduce significant changes.

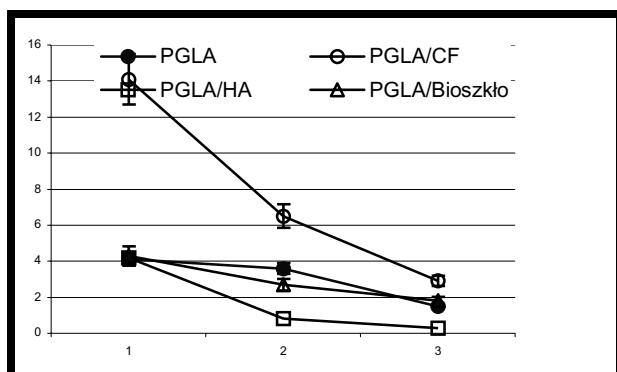
Pure PLGA and composite samples were incubated in Ringer fluid at the temperature of 37°C during 4 and 8 weeks. After these periods changes of their mechanical properties were examined, as well as observations of samples surfaces were performed using the scanning electron microscope. As the results shown in FIG.3 indicate, the decrease of bending strength can be noticed, and the most significant changes occurred in composites PLGA/CF and PLGA/HA.

The effect of the presence of carbon fibres on premature degradation of PGLA/CF composite were also noted in previous works [11]. Additionally, the attenuation of mechani-

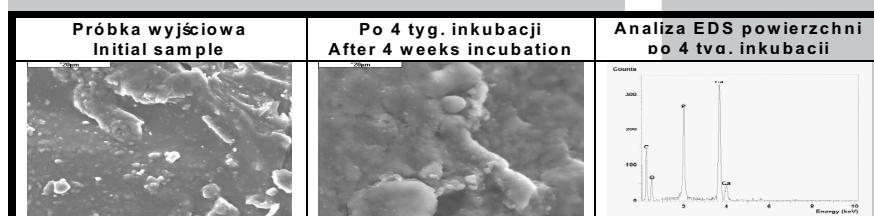


RYS. 3. Zmiana wartości wytrzymałości na zginanie dla badanych próbek: 1 - wyjściowych, 2 - po 4 tygodniach inkubacji, 3 - po 8 tygodniach inkubacji.

FIG. 3. Changes of bending strength values of the examined samples: 1 -initial, 2 - after 4 weeks incubation, 3 -after 8 weeks incubation.



RYS. 4. Zmiana wartości modułu Younga dla badanych próbek: 1 - wyjściowych, 2 - po 4 tygodniach inkubacji, 3 - po 8 tygodniach inkubacji.
FIG. 4. Changes of Young moduli for examined samples: 1 - initial, 2 - after 4 weeks incubation, 3 - after 8 weeks incubation.

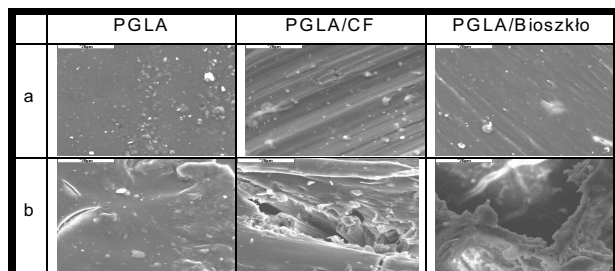


RYS. 5. Obrazy SEM powierzchni kompozytu PGLA/HA i analiza EDS powierzchni po 4 tygodniach inkubacji.
FIG. 5. SEM surface images of PGLA/HA composite and EDS surface analysis after 4 weeks.

z RYS.3 dla wszystkich badanych materiałów zaobserwowano spadek wartości wytrzymałości na zginanie przy czym bardzo duże zmiany otrzymano dla kompozytu PLGA/CF oraz PGLA/HA.

Wpływ obecności włókien węglowych na wcześniejszą degradację kompozytu PGLA/CF stwierdzono też we wcześniejszych pracach [11]. Dodatkowo za osłabienie właściwości mechanicznych mogą być odpowiedzialne reakcje zachodzące na granicach międzyfazowych włókna (cząstki) - osnowa polimerowa. Podobne efekty zaobserwowano dla kompozytów z polimerów biostabilnych [12]. Najbardziej stabilne właściwości otrzymano dla czystego polimeru oraz próbek modyfikowanych bioszkiem.

Podobne wnioski można wysnuć na podstawie obserwacji zmiany modułów Younga (RYS.4). Największe zmiany zaobserwowano również w przypadku kompozytu PLGA/CF i PGLA/HA, a najbardziej stabilne właściwości wykazywały próbki z czystego PGLA i modyfikowane bioszkiem. Pomimo redukcji właściwości mechanicznych pod wpływem inkubacji w warunkach in vitro kompozyty PGLA/HA wykazują korzystne zachowanie biologiczne. Potwierdzają to obserwacje powierzchni próbek inkubowanych w sztucznym środowisku biologicznym (RYS.5).



RYS. 6. Obrazy SEM powierzchni: a - próbki wyjściowe; b - po inkubacji w warunkach in vitro przez 4 tygodnie.
FIG. 6. SEM surface images: a - initial samples; b - after incubation under in vitro conditions during 4 weeks.

cal properties may appear due to reactions at the fibres (particles) - polymer matrix interfaces. Similar effects were observed in composites made of biostable polymers [12]. The most stable properties were obtained for pure polymer and samples modified with bioglass. Similar conclusions could have been drawn based on observations of Young moduli (Fig.4). The most important changes were observed in the case of PLGA/CF and PGLA/HA composites, whereas the most stable properties were shown by samples of pure PLGA and those modified with bioglass.

Despite the deterioration of mechanical properties after incubation under in vitro conditions, the PGLA/HA composites still showed the advantageous biological behaviour. This was confirmed by observations of surfaces of samples incubated in artificial biological environment (FIG.5). Microscopic observations of PGLA/HA composite after 4 weeks incubation revealed surfaces with hydroxyapatite particles appearing due to polymer degradation. The areas were also found where HA secretions were observed on composite substrate. It confirmed that this material after

fulfilling its mechanical function and after the matrix resorption process may constitute the substrate for bone tissue growth. In the case of pure PGLA the degradation of the material was observed in form of cracks and roughnesses appearing at the surface (FIG.6).

In PGLA/CF composites fibres were disengaging from implant surface after incubation, while before they were covered by polymeric resin. The effect of uncovering the modifying phase from sample interior after incubation was also observed in the case of bioglass particles.

Conclusions

The addition of carbon fibres significantly increases the PGLA strength compared to its initial strength. However the degradation of composite containing carbon fibres commences earlier than in the case of pure polymer, and the in vitro conditions lead to significant deterioration of its mechanical properties.

The use of bioglass as modifying phase also improves mechanical properties of pure PGLA. Additionally, mechanical properties of PGLA/bioglass composite are the most stable under in vitro conditions in comparison with other composites examined in this work.

In the case of PGLA/HA composite the presence of bioactive particles affects the process of apatite growth on composite surface under in vitro conditions, which allows to form chemical bond between the implant and the bone tissue. After the matrix material degradation the presence of bioactive particles facilitates also the regeneration of diseased tissue.

Acknowledgement

This work has been realized as part of research project: PBZ-KBN-082/T08/2002, financed by the Minister of Science and Information Society Technologies.

Na powierzchni kompozytu PGLA/HA po 4 tygodniach inkubacji zaobserwowano odsłaniające się na skutek degradacji polimeru powierzchnie z cząstkami hydroksyapatytu. Znalezione też obszary, w których widoczne były wydzielania HA na podłożu kompozytowym, co potwierdza, że materiał ten po spełnieniu funkcji mechanicznych i po procesie resorpcji osnowy może stanowić podłoże dla wzrostu tkanki kostnej.

W przypadku czystego PGLA, po inkubacji zaobserwowano degradację materiału w postaci pęknięć i nierówności widocznych na powierzchni (RYS.6).

Dla kompozytów PGLA/CF po inkubacji widoczne były uwalniające się włókna z powierzchni implantu, które wcześniej zasłaniała żywica polimerowa. Efekt odkrywania modyfikującej fazy z wnętrza próbki po inkubacji zaobserwowano również w przypadku bioszklą.

Wnioski

Dodatek włókien węglowych znacznie powiększa wartość wytrzymałości na zginanie i modułu Younga PGLA w stosunku do wytrzymałości wyjściowej. Jednocześnie degradacja kompozytu z włóknem węglowym rozpoczyna się wcześniej niż w przypadku czystego polimeru, a warunki in vitro powodują znaczne osłabienie jego właściwości mechanicznych.

Zastosowanie jako fazy modyfikującej bioszklą również poprawia właściwości mechaniczne czystego PGLA. Ponadto właściwości mechaniczne kompozytu PGLA/Bioszklą są najbardziej stabilne w warunkach in vitro w porównaniu do innych badanych kompozytów.

W przypadku kompozytów PGLA/HA obecność bioaktywnych cząstek wpływa na proces narastania apatytu w warunkach in vitro na powierzchni kompozytu, co umożliwia po implantacji powstanie chemicznego złącza implant - tkanka kostna, a po degradacji osnowy ułatwia proces regeneracji chorej tkanki.

Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach projektu badawczego: PBZ-KBN-082/T08/2002, finansowanego przez Ministra Nauki i Informatyzacji.

ZASTOSOWANIE KOMPOZYTÓW CERAMIKA - POLIMER O OSNOWIE Z CERAMICZNEGO TWORZYWA POROWATEGO Z FOSFORANÓW WAPNIOWYCH W INŻYNIERII TKANKOWEJ

M.SZAFRAN*, E.BOBRYK*, R.RZESZUTEK*,
A.CHRÓŚCICKA**, M.LEWANDOWSKA-SZUMIEL**

*POLITECHNIKA WARSZAWSKA, WYDZIAŁ CHEMICZNY

**AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE,
ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA

Streszczenie

W artykule przedstawione zostały wyniki badań nad otrzymaniem materiału kompozytowego ceramiczno - polimerowego o osnowie z ceramicznego tworzywa

Piśmiennictwo

References

- [1] Ramakrishna S., Mayer J., Wintermantel E., Kam W. Leong: Bio-medical applications of polymer - composite materials: a review, Comp. Scien. And Techn. 61(2001), s.1189-1224
- [2] Mano J.F., Sousa R.A., Boesel L.F., Neves N.M., Reis R.L., Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments, Composites Science and Technology 64 (2004) 789-817.
- [3] Chłopek J., Kompozyty w medycynie, Kompozyty, nr 1, (2001), s.50-541.
- [4] Ignjatovic N., Uskokovic D., Synthesis and application of hydroxyapatite/poly(lactide) composite biomaterial, Applied Surface Science 238 (2004) 314-319.
- [5] Shikunami Y., Okuno M., Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly L-lactide (PLLA). Practical properties of miniscrews and miniplates, Biomaterials 22 (2001) 3197-3211.
- [6] Dauner M., Caramaro M., Missirlis Y., Panagiotopoulos E., Resorbable continuous - fibre reinforced polymers for osteosynthesis, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 9, (1998) 173 - 179.
- [7] Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M., Nowe możliwości syntezy i zastosowania w medycynie biodegradowalnych kopolimerów glikolidu nie zawierających cyny, Inż. Biomateriałów, (2002) Rok V, nr 23-25, 27-29.
- [8] Haberko K., Bućko M., Haberko M., Mozgawa W., Pyda A., Zarębski J., Hydroksyapatyt naturalny - preparatyka, właściwości, Inż. Biomateriałów, (2003) Rok VI, nr 30-33, 32-38.
- [9] Łączka M., Cholewa - Kowalska K., Niedzielski K., Biomateriały żelowe w ortopedii - badania in vivo, Inż. Biomateriałów Rok IV, nr 17 - 19 (2001) 16-18.
- [10] Nazhat S.N., Joseph R., Wang M., Smith R., Tanner K.E., Bonfield W. Dynamic mechanical characterisation of hydroxyapatite reinforced polyethylene: effect of particle size. J Mater Sci Mater in Med 11 (2000) 621-8.
- [11] Chłopek J., Morawska A., Umańska L., Paluszkiwicz C., Badanie procesu degradacji kompozytów z polimerów resorbowanych w warunkach in vitro, Inżynieria Biomateriałów, Rok VII, nr 38 - 42 (2004) 132-136.
- [12] Rosół P., Chłopek J., Wpływ warunków in vitro na stan granic międzyfazowych kompozytów włóknistych stosowanych na implanty, Inżynieria Biomateriałów, nr 28, Rok VI (2003) 26-30.

APPLICATION OF POLYMER-CERAMIC COMPOSITES BASED ON A CALCIUM PHOSPHATE POROUS CERAMIC MATERIAL IN TISSUE ENGINEERING

M.SZAFRAN*, E.BOBRYK*, R.RZESZUTEK*,
A.CHRÓŚCICKA**, M.LEWANDOWSKA-SZUMIEL**

*WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF CHEMISTRY

**MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, DEPARTMENT OF HUMAN
BIOPHYSICS AND PHYSIOLOGY,

Abstract

The paper presents the results of studies on obtaining polymer-ceramic composites based on a porous ceramic material. In the composite developed the ceramic phase consists of a porous ceramic sinter

porowatego W opracowanym kompozycie fazę ceramiczną stanowi porowaty spiek z mieszaniny hydroksyapatytu i fosforanu wapnia, a fazą polimerową wypełniającą pory ceramicznego tworzywa ceramicznego jest biodegradowalny makromonomer laktydowo-węglanowy, w różnym stopniu wypełniający pory ceramicznej osnowy.

Opracowane materiały zostały poddane wstępnym badaniom pozwalającym zakwalifikować kompozyt jako nośnik dla żywych komórek a także sprawdzić możliwość stosowania tej grupy materiałów w inżynierii tkankowej. Z pierwszych prób wynika, że zastosowane materiały z fosforanów wapnia są dobrze tolerowane przez ludzkie komórki osteogenne w hodowli *in vitro*.

Słowa kluczowe: bioceramika, kompozyty ceramiczno - polimerowe, ceramika hydroksyapatytowa, makromonomery laktydowo - węglanowe, biodegradacja.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),92-96]

Wstęp

Najczęściej stosowanymi współcześnie materiałami substytutowymi tkanki kostnej są przeszczepy autogeniczne, allop przeszczepy, ale również znajdują tu zastosowanie różnego typu materiały syntetyczne takie jak polimery, metale, kompozyty czy ceramika [1].

Badania w dziedzinie biomateriałów dowodzą, że niewątpliwie najlepszym substytutem kości ludzkiej (ściślej mówiąc części nieorganicznej) jest spiekana porowata ceramika z fosforanów wapnia oparta na hydroksyapatycie ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) i/lub β -fosforanie trójwapniowym ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Ich skład chemiczny jest bardzo zbliżony do składu chemicznego naturalnej kości, co zapewnia dobrą biogodność w miejscu kontaktu ceramika - kość [1]. Odpowiednio zaprojektowane w procesie technologicznym ceramiczne tworzywo porowate stanowi materiał morfologicznie zbliżony do struktury gąbczastej tkanki kostnej. Optymalny dobór wielkości porów umożliwia przerastanie implantu tkanką kostną. Porowata ceramika hydroksyapatytowa charakteryzuje się niską odpornością na kruche pękanie, co niewątpliwie stanowi wadę materiału, którego przeznaczeniem jest pełnienie funkcji mechanicznych. Poprawę właściwości mechanicznych porowatej ceramiki z fosforanów wapnia uzyskać można poprzez połączenia kompozytowe, w którym ceramiczne tworzywo porowate stanowi osnowę [2]. Wprowadzenie w pory ceramicznego tworzywa porowatego odpowiednio wyselekcjonowanego polimeru organicznego prowadzi do uzyskania nowych charakterystyk wytrzymałościowych kompozytu [3]. Biodegradowalny polimer wyścielający pory ceramicznej osnowy pozwala także na stopniowe przerastanie kompozytu tkanką kostną poprzez jednoczesną degradację polimeru w środowisku płynów ustrojowych.

Powyższe założenia zrealizowano przez wytworzenie ceramiki z mieszaniny hydroksyapatyt / β -fosforan trójwapniowy o założonej wielkości porów metodą osadzania ceramicznej masy lejnej na podłożu polimerowym (polymeric sponge method) i spiekaniu w optymalnie wybranej temperaturze, a następnie polimeryzację *in situ* makromonomeru laktydowo - węglanowego w porach ceramicznego tworzywa porowatego.

Materiały i metodyka badań

W badaniach nad otrzymywaniem ceramicznego tworzywa porowatego wykorzystano następujące proszki cera-

of a mixture of hydroxyapatite and calcium phosphate, and the polymer phase, filling the pores of the ceramic material, consists of a biodegradable lactide-carbonate macromonomer which fills, to a variable degree, the pores of the ceramic base.

The obtained materials were subjected to preliminary investigations enabling to qualify the composite as a carrier for living cells and to check the possibility of using this group of materials in the tissue engineering. Preliminary tests have shown that the calcium phosphate materials used are well tolerated by osteogenic human cells in *in vitro* cultures.

Key words: bioceramics, polymer-ceramic composites, hydroxyapatite ceramics, lactide-carbonate macromonomers, biodegradation.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),92-96]

Introduction

Substitute materials for bone tissue, most often used nowadays, are mainly of autogenic nature, as alloimplants, but synthetic materials such as polymers, metals, composites or ceramics are also applied [1].

Investigations of biomaterials have shown that sintered porous ceramics of calcium phosphates based on hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) and/or tri-calcium β -phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) are the best substitute for human bone (or, more precisely, of its inorganic part). Their chemical composition is very close to that of natural bone that guarantees a good biocompatibility in the contact bone - ceramics [1]. A porous ceramics material, properly designed in the technological process, is a material morphologically similar to the spongy structure of bone tissue. An optimal selection of pore size enables the implant to intergrow by the bone tissue. Porous hydroxyapatite ceramics is characterised by a low resistance to brittle cracking which is undoubtedly a disadvantage of the material intended for fulfilling mechanical functions. The mechanical properties of porous calcium phosphate ceramics can be improved by making composite structures based on porous ceramic materials [2]. Impregnation of a porous ceramic material with a properly selected organic polymer enables to obtain new strength characteristics of the composite [3]. A biodegradable polymer deposited in the pores of the ceramic base enables also a gradual intergrowth of the composite by bone tissue with simultaneous degradation of the polymer in the medium of body fluids.

The above assumptions have been realised by preparation, by the polymeric sponge method, of a mixed hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ceramics of predetermined pore size, followed by a sintering, at a selected optimum temperature and subsequent polymerisation *in situ* of a lactide-carbonate macromonomer in the pores of the ceramic material obtained.

Materials and investigations methods

The following ceramic powders were used in the studies on obtaining porous ceramic materials: hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) produced by Aldrich, of specific surface 62,95 m^2/g (BET), β -tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) produced by Aldrich, of specific surface 63,75 m^2/g (BET), and calcium phosphate enriched with OH groups $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$ produced by Sigma, of specific surface 83,61 m^2/g (BET). The process of sintering the phosphate ceramics was studied with the use of monoaxially pressed samples burned at temperature 1300, 1350 or 1400°C/1h. The samples were subjected to determination of linear shrinkage, open porosity,

miczne: hydroksyapatyt ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) prod. Aldrich o powierzchni właściwej $62,95 \text{ m}^2/\text{g}$ (BET), β -fosforan trójwapienny ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) prod. Aldrich o powierzchni właściwej $63,75 \text{ m}^2/\text{g}$ (BET) i fosforan wapienny wzbogacony grupami - OH $\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$ prod. Sigma o powierzchni właściwej $83,61 \text{ m}^2/\text{g}$ (BET). Badanie procesu spiekania ceramiki fosforanowej przeprowadzono na kształtkach prasowanych jednoosiowo i wypalonych w temperaturze 1300 , 1350 i $1400^\circ\text{C}/1\text{h}$, na których oznaczono skurczliwość liniową, porowatość otwartą, oraz gęstość względną i pozorną. Jako podłoże polimerowe wybrano gąbki poliuretanowe prod. Eurofoam Polska Sp. z o. o. o wielkości porów: $440\text{--}520 \mu\text{m}$ (S31048), $520\text{--}720 \mu\text{m}$ (S31062), $740\text{--}1040 \mu\text{m}$ (S28089) i $1080\text{--}1580 \mu\text{m}$ (S28133), z których po nasączeniu wodą i zamrożeniu wycinano cylindryczne kształtki. Kształtki te następnie nasączano ceramiczną masą lejną otrzymaną na bazie mieszaniny hydroksyapatytu (Aldrich) / β -fosforan trójwapienny (Aldrich) o stosunku wagowym komponentów 1:3. Próbkę były suszone i spiekane w 1300°C przez 1h w piecu oporowym typu Carbolite z programowaną szybkością wzrostu temperatury: do 800°C - $1^\circ\text{C}/\text{min}$, do 1300°C - $5^\circ\text{C}/\text{min}$. Makromonomer laktidowy - węglanowy o stężeniu 14, 24 i 30,5% wprowadzano w pory ceramicznego tworzywa porowatego, a następnie polimeryzowano w atmosferze azotu w temperaturze 65°C . Badania mikrostrukturalne przeprowadzono w mikroskopie skaningowym typu Leo 1530. Otrzymane materiały ceramiczne i kompozyty ceramika - polimer poddano badaniom in vitro mającym na celu sprawdzenie możliwości ich zastosowania jako nośników żywych komórek w inżynierii tkankowej.

and relative and apparent densities. As the polymeric base we chose polyurethane foams produced by Eurofoam Polska Sp. z o. o. of pore size $440\text{--}520 \mu\text{m}$ (S31048), $520\text{--}720 \mu\text{m}$ (S31062), $740\text{--}1040 \mu\text{m}$ (S28089) or $1080\text{--}1580 \mu\text{m}$ (S28133), from which cylindrical samples were cut out after soaking with water and freezing. The obtained shapes were then soaked with casting slip based on a mixture of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate (1:3 by weight). The specimens were dried and sintered for 1 h at 1300°C in a resistance furnace of Carbolite type with programmed temperature increase: $1^\circ\text{C}/\text{min}$ up to 800°C , $5^\circ\text{C}/\text{min}$ to 1300°C . The lactide-carbonate macromonomer in concentrations 14, 24 or 30,5% was soaked into the pores of the ceramic material and then polymerised at 65°C in nitrogen atmosphere. Microstructure studies were carried out in a scanning microscope type Leo 1530. The obtained ceramic materials and the ceramics-polymer composites were subjected to in vitro tests with the aim of checking the possibility of using them as a carrier of living cells in tissue engineering.

Results

The physical properties of ceramic plates obtained from various phosphate materials after sintering for 1 h at 1300°C are presented in TABLE 1. The obtained data show that the applied sintering temperature does not enable to consolidate sufficiently pure hydroxyapatite ceramics ($d_w=75\%$), and the tests with sintering at higher temperatures (1350 and 1400°C) resulted in degradation of crystal structure of the hydroxyapatite. On the other hand, the ceramics pre-

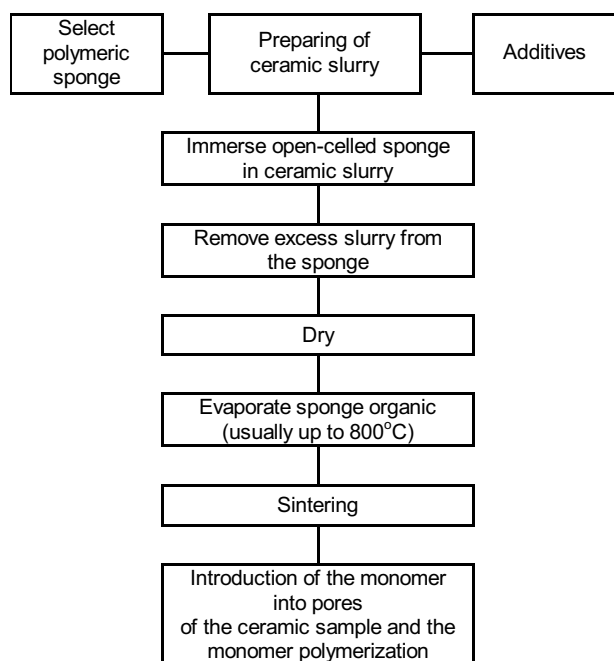
Material próbki material of the sample	Porowatość otwarta P_o [%] open porosity	Gęstość pozorna d_r [g/cm ³] apparent density	Gęstość względną d_{wzgl} [%] relative density	Skurczliwość liniowa S_l [%] linear shrinkage	Mikrotwardość HV[MPa] microhardness
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ (Aldrich)	21,04	2,20	75,30	15,8	137,3
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Aldrich)	5,81	2,69	91,93	18,6	1213,5
$\text{Ca}_5\text{HO}_{13}\text{P}_3$ (Sigma)	1,29	2,92	99,58	26,6	1903,1
mieszanina 3:1 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 : \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ (Aldrich / Aldrich)	0,52	2,79	95,38	23,0	2442,7

TABELA 1. Właściwości fizyczne ceramiki fosforanowej (temp. spiekania $1300^\circ\text{C}/1\text{h}$).
TABLE 1 Physical properties of samples from the phosphate ceramic (sintering temperature - $1300^\circ\text{C}/1\text{h}$).

Wyniki

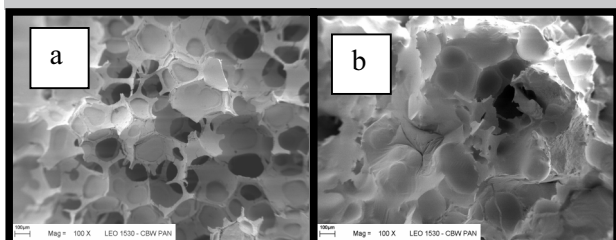
W TABELI 1 przedstawiono właściwości fizyczne kształtek ceramicznych otrzymanych z różnych materiałów fosforanowych po spiekaniu w temp. 1300°C przez 1h. Z danych tych wynika, że niemożliwe jest osiągnięcie w tej temperaturze dobrego zagęszczenia ceramiki z czystego hydroksyapatytu ($d_w=75\%$), a przeprowadzane próby spiekania w wyższych temperaturach (1350 i 1400°C) prowadziły do degradacji struktury krystalicznej hydroksyapatytu. Natomiast ceramika otrzymana z mieszaniny hydroksyapatytu i fosforanu trójwapiennego zestawionych w stosunku wagowym 1:3, ma wysoką gęstość ($>95\%$) i prawie 20-krotnie wyższą mikrotwardość Vickersa w porównaniu do spie-

pared from a 1:3 mixture of hydroxyapatite and tricalcium phosphate had a high density ($>95\%$) and the Vickers microhardness almost 20-fold as high as that of the hydroxyapatite sinters, as necessary to provide the stability of the ceramic skeleton in the composite samples developed. FIGURE 1 gives a schematic presentation of obtaining polymer-ceramic composite shapes by depositing calcium phosphate casting slip in the polymeric substrate with subsequent sintering and filling the porous ceramics with the polymeric phase. The polymer-ceramic composites have the open porosity about 75%. Depending on concentration of the lactide-carbonate macromonomer and on pore size of the polymeric substrate the pores can be filled with the polymer in 12 to about 40%, as shown in FIG. 2. FIGURE 3 shows the skeleton microstructure of the phosphate ceramics (3a) and a partial filling of its pores by the polymer (3b). The aim of the successive stage of the studies was to observe the survival of osteoblast cells in close contact with dense ceramic obtained from a mixture of hydroxyapatite and tricalcium phosphate, lactide-carbonate polymer foil, or polymer drifted on ceramic. Every experimental series



RYS. 1. Schemat otrzymywania kompozytu ceramika-polimer.

FIG. 1. Schematic representation of procedure for obtaining ceramic-polymer composite materials.



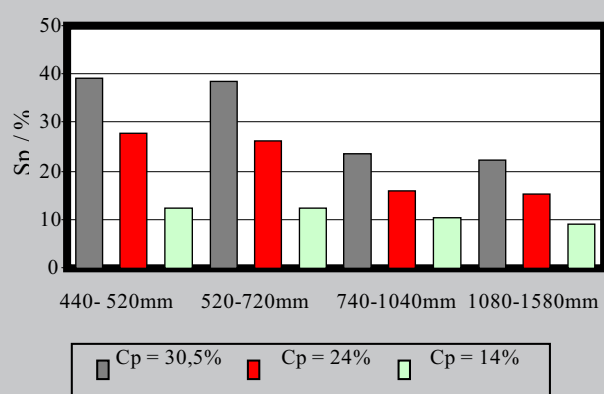
RYS. 3. Mikrostruktura próbek z ceramiki fosforanowej przed (a) i po wypełnieniu porów polimerem laktydowo-węglanowym (b). SEM.

FIG. 3. Microstructure of samples from the phosphate material before (a) and after filling the pores with a lactide-carbonate polymer (b). SEM.

ków z hydroksyapatytu, co jest niezbędne dla trwałości szkieletu ceramicznego w projektowanych próbkach kompozytowych.

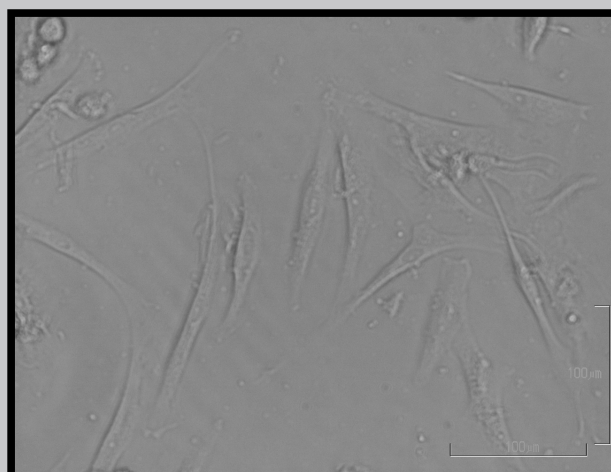
Na RYS.1 przedstawiono schemat otrzymywania kształtek kompozytowych ceramika-polimer metodą osadzania masy lejnej z fosforanów wapnia na podłożu polimerowym, następnie spiekania i wypełniania porowatej ceramiki fazą polimerową. Kompozyty ceramika - polimer charakteryzują się porowatością otwartą około 75% i w zależności od stężenia makromonomeru laktydowo - węglanowego i od wielkości porów polimerowego podłoża pory te wypełnić można polimerem w zakresie od 12 do około 40%, co ilustruje RYS.2. Natomiast RYS.3 przedstawia szkieletową mikrostrukturę ceramiki fosforanowej (3a) oraz częściowe wypełnienie jej porów polimerem (3b).

We wstępnym etapie badań obserwowano przeżywalność komórek osteoblastów w bezpośrednim kontakcie z gęstą ceramiką otrzymaną z mieszaniny hydroksyapatytu i fosforanu trójwapniowego, folią z polimeru laktydowo-węglanowego oraz ceramiką pokrytą warstwą-polimeru. Serie obejmowały sześć kształtek z każdego rodzaju materiału. Z przeprowadzonych analiz in vitro uzyskano pozytywne rezulta-



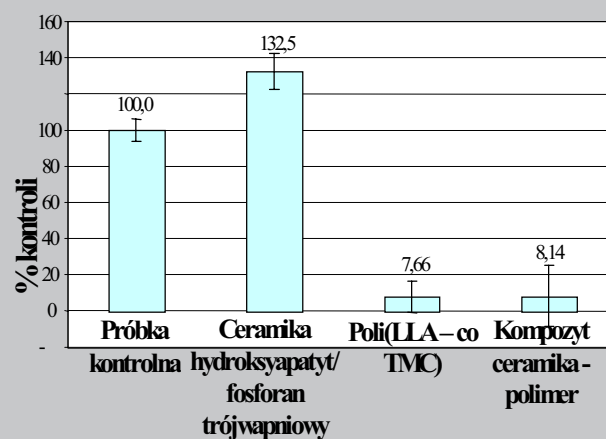
RYS. 2. Wpływ wielkości porów ceramicznego tworzywa porowatego oraz stężenia polimeru (C_p) na stopień wypełnienia porów (S_p) kompozytu.

FIG. 2. Effect of pore size of porous ceramic material and concentration of polymer (C_p) on degree of pore filling (S_p) of the composite.



RYS. 4. Komórki osteoblastów w bezpośrednim kontakcie z ceramiką z fosforanu trójwapniowego (Aldrich). Powiększenie 20x.

FIG. 4. Osteoblast cells in close contact on tricalcium phosphate ceramic. Magnification 20x..



RYS. 5. Test aktywności mitochondrialnej komórek wysianych na materiałach ceramicznych i polimerowych.

FIG. 5. Test of mitochondrial activity of living cells spread on ceramic materials and polymer materials.

ty dla hodowli komórkowych prowadzonych na podłożu otrzymanym na bazie hydroksyapatytu i fosforanu trójwapiennego, co pozwala sądzić o słuszności obranej tezy zastosowania tej grupy materiałów jako nośników żywych komórek w inżynierii tkankowej. Badania przeprowadzone na foliach z polimeru laktydowo - węglanowego pokazują, że produkt finalny nie był materiałem czystym pod względem biologicznym, czego następstwem była bardzo niska przeżywalność komórek osteogennych wysianych na takie podłoże. Wyniki tych badań przedstawiono na RYS.4i5

Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych badań otrzymano kompozyty ceramika - polimer o osnowie na bazie fosforanów wapnia, w których pory są częściowo wypełnione polimerem laktydowo - węglanowym. Zastosowana metoda osadzania ceramicznej masy lejnej na podłożu z gąbek poliuretanowych pozwala na kontrolę wielkości porów. Stopień zapełnienia porów ceramicznej osnowy kompozytów ceramika - polimer jest wielkością zależną od wielkości porów stosowanego podłoża polimerowego oraz od stężenia makromonomeru laktydowo - węglanowego stosowanego do infiltracji porów ceramicznego tworzywa porowatego. Ponadto z wstępnych badań z zakresu inżynierii tkankowej wynika, że żywe komórki kości (osteoblasty) hodowane w kontakcie z ceramiką fosforanową wykazują zadowalający poziom przeżywalności wysianych w hodowli komórek.

Podziękowania

Praca finansowana z grantu PBZ-KBN-082/T08/2002/06

Piśmiennictwo

- [1] D.Tadic, F.Beckmann, K.Schwarz, M.Epple, A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering, *Biomaterials* 25 (2004).
- [2] M.Szafran, G.Rokicki, K.Konopka, W.Lipiec, K.Kurzydłowski, Kompozyty na bazie porowatej ceramiki infiltrowanej metalami i polimerami, *Kompozyty*, 2(5), (2002).

comprised six samples of each of the materials tested. The analyses carried out in vitro have given positive results for cell cultures grown on substrate obtained on the basis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate. The results thus confirm the thesis that this group of materials may serve as a carrier of living cells in the tissue engineering. The experiments carried out on the lactide-carbonate polymer foils showed that the final material had not been biologically pure and, as a result, the survival of osteogenic cells inoculated on such substrate was low. The results of the studies are shown in FIGs.4 and 5.

Summary

The studies performed enabled to obtain polymer-ceramic composites based on calcium phosphates with the pores partially filled with a lactide-carbonate polymer. The applied method of depositing ceramic casting slip on polyurethane foam substrates enabled to control the pore size. The degree of filling the pores of the ceramic base of the polymer-ceramic composites depends on the pore size of the polymer substrate applied and on concentration of the lactide-carbonate macromonomer used for infiltration of pores of the ceramic porous material. Preliminary studies by the methods of tissue engineering have shown that living bone cells (osteoblasts) have a satisfactory level of survival on the phosphate ceramics substrate applied.

Acknowledgements

This work was financially supported by research grant PBZ-KBN-082/T08/2002/06

References

- [3] M. Szafran, E. Bobryk, M. Bereza, P. Parzuchowski, Ceramic-Polymer Composites based on porous Hydroxyapatite and Lactide-Carbonate Macromonomers, *Engineering of Biomaterials*, Nr 38-42, (2004).

BADANIA ODPORNOŚCI KOROZYJNEJ STOPU Co-Cr-W-Ni Z PRZEZNACZENIEM NA IMPLANTY STOSOWANE W KARDIOLOGII ZABIEGOWEJ

WITOLD WALKE, ZBIGNIEW PASZENDA, JAN MARCINIAK

CENTRUM INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ, POLITECHNIKA ŚLĄSKA,
UL. AKADEMICKA 2A, 44-100 GLIWICE

[*Inżynieria Biomateriałów*, 47-53,(2005),96-99]

Wprowadzenie

Stenty naczyniowe w ostatniej dekadzie ubiegłego stulecia w sposób zasadniczy zmieniły metody oraz skuteczność leczenia choroby niedokrwiennej serca. Stało się to możliwe dzięki wykorzystaniu dotychczasowych doświadczeń związanych z implantacją tworzyw metalowych do

CORROSION RESISTANCE OF Co-Cr-W-Ni ALLOY DESIGNED FOR IMPLANTS USED IN OPERATIVE CARDIOLOGY

WITOLD WALKE, ZBIGNIEW PASZENDA, JAN MARCINIAK

SILESIA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
CENTER OF BIOMEDICAL ENGINEERING,
ST.AKADEMICKA 2A, 44-100 GLIWICE

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),96-99]

Introduction

Effectiveness of an ischaemic heart disease treatment was fundamentally changed in recent years by vascular stents. It was possible because of experiences connected with implantation of metallic materials into human body (not only into cardiovascular system). Furthermore, the PTCA

organizmu ludzkiego (nie tylko do układu krwionośnego). Ponadto zaadaptowanie, do rozprężania stentów w naczyniu stosowanej już techniki PTCA zapewniło małąinwazyjność, bezpieczeństwo zabiegu oraz zmniejszyło prawdopodobieństwo wystąpienia restenozы [1-3].

Najczęściej na stenty naczyniowe stosuje się gatunki stali austenitycznej Cr-Ni-Mo. Wytwarza się z nich około 90% stentów dostarczanych obecnie przez producentów światowych. Ta grupa biomateriałów od wielu lat jest znana i powszechnie stosowana, głównie na implanty krótkotrwałe np. w chirurgii urazowo-ortopedycznej, szczękowo-twarzowej, torakochirurgii [1,2]. W ostatnim okresie obserwuje się próby zastosowania również stopów na osnowie Co do wytwarzania stentów naczyniowych. Z tego też powodu w pracy zaproponowano technologię obróbki powierzchniowej takiego stopu, bardzo istotnej z punktu widzenia odporności korozyjnej minimalizującej odczyn i powikłania pooperacyjne.

Material i metodyka badań

W pracy zbadano odporność korozyjną stopu Co-Cr-W-Ni (L 605) z przeznaczeniem na implanty stosowane w kardiologii zabiegowej. Badania prowadzono na próbkach w postaci pręta o średnicy $d=5$ mm i długości $l=10$ cm. Zastosowany do badań materiał spełniał wymagania stawiane materiałom implantacyjnym pod względem składu chemicznego, struktury i własności mechanicznych.

Pomiary prowadzono na próbkach o powierzchni szlifowanej, polerowanej elektrolitycznie oraz polerowanej elektrolitycznie i pasywowanej chemicznie w warunkach opracowanych przez autorów. Badania odporności na korozję wżerową realizowano w oparciu o rejestrację krzywych polaryzacji anodowej metodą potencjodynamiczną z wykorzystaniem systemu do badań elektrochemicznych VoltaLab® PGP 201 [4]. Jako elektrodę odniesienia zastosowano nasyconą elektrodę kalomelową (NEK) typu KP-113. Pomiar realizowano w elektrolicie symulującym środowisko krwi człowieka (sztuczny osoczu) o temperaturze $37\pm1^\circ\text{C}$ i $\text{pH}=7,2$ - TABELA 1. Z uwagi na stosowaną technikę implantacji stentów naczyniowych w pracy oceniono również podatność warstwy pasywnej do odkształceń plastycznych. Próbkę odkształcano w próbie zginania o kąt 30° , 60° i 90° . Badanie odporności na korozję szczelinową prowadzono zgodnie z zaleceniami normy [5]. Próbkę polaryzowano przy potencjale 0,8 V przez okres 900 sekund.

Wyniki badań

Przeprowadzone badania elektrochemiczne w sztucznym osoczu wykazały wpływ sposobu przygotowania powierzch-

Składniki roztworu Ingredients	Stężenie składników w roztworze, g/l wody destylowanej Ingredients concentration, g/l distilled water
NaCl	6,8
CaCl ₂	0,2
KCl	0,4
MgSO ₄	0,1
NaHCO ₃	2,2
Na ₂ HPO ₄	0,126
NaH ₂ PO ₄	0,026

TABELA 1. Skład chemiczny sztucznego osocza wg PN - EN ISO 10993-15.

TABLE 1. Chemical composition of the artificial plasma according to PN ENISO 10993-15 standard

ni próbek ze stopu Co-Cr-W-Ni na ich odporność korozyjną - TABELA 2. Wartość potencjału korozyjnego dla próbek

technique applied to expand stents in vessels ensured safety, small invasion and reduced the risk of restenosis [1-3].

Stainless steels are the most common metallic biomaterials used for vascular stents. Almost 90% of these stents is made of steel. Since many years this group of biomaterials is in common use mainly as short term implants, for example in an orthopaedic surgery, a dental surgery and a thoracosurgery [1, 2]. In recent years attempts to apply Co alloys for vascular stents are observed. For this reason a surface treatment of that alloy is presented in this work. The surface treatment is important because of corrosion resistance minimizing reactions and postoperative complications.

Material and methods

In the work the corrosion resistance of Co-Cr-W-Ni (L 605) alloy was tested. The alloy is used for implants applied in operative cardiology. Tests were carried out on samples in the form of a rod of diameter $d = 5\text{mm}$ and length $l = 10\text{mm}$. The applied material met requirements regarding chemical composition, structure and mechanical properties. The tests were carried out on grinded, electropolished and passivated samples in conditions worked out by the authors. The pitting corrosion tests were realized by recording of anodic polarization curves with the use of the potentiodynamic method. The VoltaLab® PGP 201 system for electrochemical tests was applied [4].

The saturated calomel electrode (SCE) of KP-113 type was applied as the reference electrode. The tests were carried out in electrolyte simulating human blood environment (artificial plasma) at the temperature of $37\pm1^\circ\text{C}$ and $\text{pH}=7,2$ - TABLE 1. Owing to the implantation technique of vascular stents, a deformability of a passive layer was also evaluated with the use of the bend test. Bend angles were equal to 30° , 60° and 90° .

Crevice corrosion resistance was carried out in accordance to the standard [5]. The samples were polarized in the potential of 0,8 V for 900 seconds.

Results

Results of electrochemical tests have revealed the influence of surface preparation of the Co-Cr-W-Ni alloy on the corrosion resistance - TABLE 2. For grinded samples, the

Sposób przygotowania próbek Surface preparation method	Potencjał korozyjny Corrosion potential E_{kor} , [mV]	Potencjał transpasywacji Transpassivation potential E_{tr} , [mV]	Opór polaryzacyjny Polarization resistance R_p , [M Ωcm^2]
Szlifowane grinded	-211 ± 173	+780 ± 800	0,32 $\pm 0,45$
Polerowane elektrolitycznie electropolished	-66 ± 50	+815 ± 825	0,78 $\pm 1,12$
Polerowane elektrolitycznie i pasywowane chemicznie Electropolished and passivated	+51 ± 57	+825 ± 835	2,05 $\pm 2,17$

TABELA 2. Wyniki badań odporności na korozję wżerową stopu Co-Cr-W-Ni.

TABLE 2. Pitting corrosion resistance of Co-Cr-W-Ni alloy.

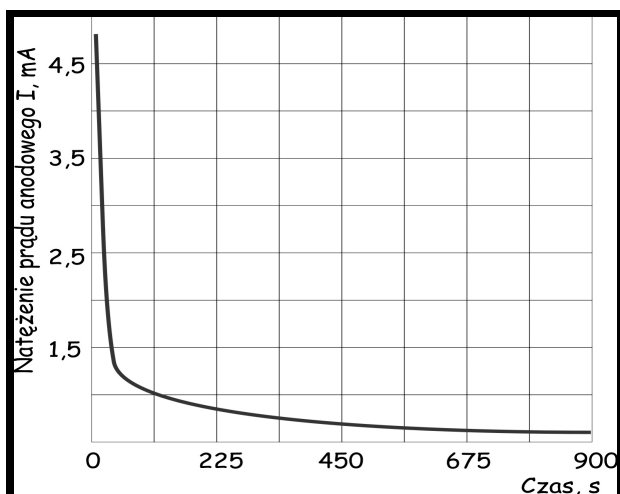
szlifowanych mieściła się w zakresie $E_{ko} = -211 \pm 173$ mV - TABELA 2. Polaryzacja próbek powodowała wzrost natężenia prądu anodowego przy potencjałach z zakresu $E_{tr} = +780 \pm 800$ mV - RYS.1. Wartość oporu polaryzacyjnego dla tak przygotowanych próbek wynosiła $R_p = 0,4 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$. Proces polerowania elektrolitycznego spowodował wzrost wartości potencjału korozyjnego do zakresu $E_{kor} = -66 \pm 55$ mV i oporu polaryzacyjnego do średniej wartości $R_p = 0,9 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$ - TABELA 2. Zarejestrowane krzywe polaryzacji anodowej w głównej mierze charakteryzowało zmniejszenie gęstości prądu anodowego w zakresie pasywnym w odniesieniu do próbek o powierzchni szlifowanej - RYS.1. Wzrost natężenia prądu anodowego obserwowano przy potencjałach z zakresu $E_{tr} = +815 \pm 825$ mV. Przeprowadzone pomiary wykazały, że dla próbek o powierzchni polerowanej elektrolitycznie i pasywowanej wartość potencjału korozyjnego mieściła się w zakresie $E_{kor} = +51 \pm 57$ mV, a wartość średnia oporu polaryzacyjnego wynosiła $R_p = 2,1 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$ - TABELA 2. Zarejestrowane krzywe polaryzacji anodowej dla tak przygotowanych próbek charakteryzowały się dalszym zmniejszeniem gęstości prądu anodowego w zakresie pasywnym - RYS.2. Polaryzacja próbek w kierunku dodatnich wartości potencjału powodowała wzrost gęstości prądu przy potencjałach z zakresu $E_{np} = +825 \pm 835$ mV.

Przeprowadzone badania próbek o powierzchni polerowanej elektrolitycznie i pasywowanej chemicznie odkształczanych w próbie zginania nie wykazały zróżnicowania ich odporności korozyjnej dla przyjętych wartości kąta zagięcia α - TABELA 3. Nie zaobserwowano tendencji do obniżania wartości potencjału korozyjnego i transpasywacji w odniesieniu do próbek nieodkształczonych.

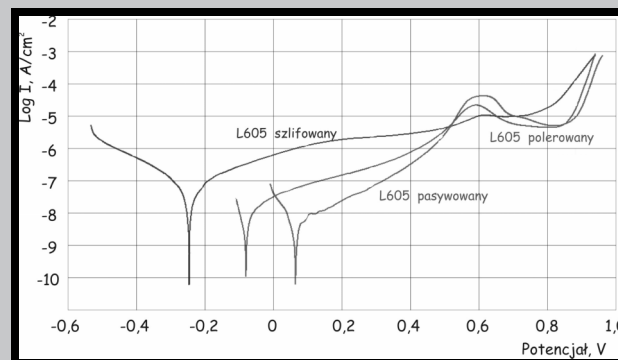
Badania odporności na korozję szczelinową przeprowadzono dla próbek o powierzchni polerowanej i spasywowanej. Po spolaryzowaniu próbek do wartości potencjału +800 mV obserwowano gwałtowne zmniejszenie gęstości prądu anodowego w funkcji czasu - RYS.2. Świadczy to o odporności tak przygotowanych próbek na korozję szczelinową.

Podsumowanie

Przeprowadzone w pracy badania wykazały korzystny



Rys. 2. Przebieg zmian prądu anodowego w funkcji czasu próbek ze stopu Co-Cr-W-Ni o powierzchni polerowanej elektrolitycznie i pasywowanej przy potencjale +800 mV.
FIG. 2. Change of anodic current in a function of time for Co-Cr-W-Ni samples of electropolished and chemically passivated surface (potential +800 mV).



RYS.1. Krzywe polaryzacji anodowej próbek ze stopu Co-Cr-W-Ni o zróżnicowanym sposobie przygotowania powierzchni.

FIG.1. Anodic polarization curves of Co-Cr-W-Ni samples after diverse surface preparation.

corrosion potential was in the range $E_{kor} = -211 \pm 173$ mV - TABLE 2. Polarization of samples caused the increase of anodic current for potentials in the range $E_{tr} = +780 \pm 800$ mV - FIG. 1. Polarization resistance of the samples was equal to $R_p = 0,4 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$.

The electropolishing process caused the increase of the corrosion potential up to $E_{kor} = -66 \pm 55$ mV and polarization resistance up to $R_p = 0,9 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$ - TABLE 2. The recorded curves of the anodic polarization were mainly characterized by the decrease of the anodic current density in the passive range with reference to the grinded samples - FIG.1. The increase of the anodic current intensity was observed for potentials in the range $E_{tr} = +815 \pm 825$ mV.

The tests have revealed that for the electropolished and passivated samples the corrosion potential was in the range $E_{kor} = +51 \pm 57$ mV and the average value of the polarization resistance was equal to $R_p = 2,1 \text{ M}\Omega\text{cm}^2$ - TABLE 2. The recorded curves of the anodic polarization were characterized by the further decrease of the anodic current density in the passive range - FIG.2. Polarization of the samples in direction of positive values of the potential caused the increase of the current density for potentials in the range $E_{np} = +825 \pm 835$ mV.

Corrosion resistance of the electropolished and the chemically passivated samples, deformed in the bend test (for the given bend angles α) was comparable - TABLE 3. No tendency to decrease the value of corrosion and transpassivation potential with reference to the non-deformed samples was observed.

Crevice corrosion tests were carried out for the electropolished and the chemically passivated samples. After polarization of the samples up to the potential of +800mV, a sudden decrease of anodic current density in a function of time was observed - FIG.2. It shows that samples prepared in this way are resistant to crevice corrosion.

Summary

The carried out tests have shown favorable influence of the applied surface treatment process on the corrosion resistance of samples made of the Co-Cr-W-Ni (L 650) alloy. The tests have revealed that the passive layer created in the electropolishing and the chemical passivation process improves the corrosion resistance of the investigated alloy. To simulate stresses and strains occurring during implantation of a stent in a blood vessel, a plastic strain was applied. Results of the corrosion resistance tests have shown that the applied plastic strain didn't change significantly the corrosion characteristic of the investigated material.

wpływ zastosowanego procesu obróbki powierzchniowej na odporność korozyjną próbek ze stopu Co-Cr-W-Ni (L 650). Przeprowadzone badania wykazały, że warstwa pasywna wytworzona w procesie polerowania elektrolitycznego i pasywacji chemicznej poprawia własności ochronne badanego stopu.

Zastosowanie odkształcenia plastycznego badanych próbek miało na celu symulację naprężeń i odkształceń, które występują w trakcie implantacji stentu w naczyniu krwionośnym. Wyniki badań korozyjnych wskazują, że proces odkształcenia plastycznego nie zmienia w sposób zasadniczy charakterystyki korozyjnej badanego materiału.

Przedstawione w pracy badania mają charakter wstępny i wymagają dalszego kontynuowania. Uzyskane wyniki są obiecujące jednak o przydatności zaproponowanej techniki uszlachetniania powierzchni stentów zadecydują dalsze badania w szczególności w środowisku krwi.

Podziękowania

Praca została zrealizowana w ramach projektu badawczego PBZ - KBN-082/T08/2002 finansowanego przez Ministra Nauki i Informatyzacji.

Piśmiennictwo

- [1] Paszenda Z., Tyrlik-Held J.: Forming the physicochemical properties of coronary stents surface. 13th Conference of the European Society of Biomechanics ESB2002, 1-4.09.2002, Wrocław, s.539-540.
- [2] Paszenda Z., Tyrlik-Held J.: Coronary stents with passive and carbon layers. Proceedings of the 17th European Conference on Biomaterials ESB2002, 11-14.09.2002, Barcelona, P89.
- [3] Bębenek B.: Przepływy w układzie krwionośnym. Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej, Kraków 1999.

KINETYKA UWALNIANIA PENTOKSYFILINY (PTX) I DOKSYCYKLINY (DOX) Z MODYFIKOWANYCH WIELOFUNKCYJNYCH IMPLANTÓW HYDROKSYAPATYTOWYCH

ANETA ZIMA, ANNA ŚLÓSARCZYK, ZOFIA PASZKIEWICZ

AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA TECHNOLOGII CERAMIKI

Streszczenie

Przedstawiono wyniki badań uwalniania się pentoksyfiliny (PTX) i doksyicykliny (DOX) jako leków modelowych z wielofunkcyjnych modyfikowanych implantów hydroksyapatytowych. Implanty takie mogą być stosowane w medycynie jako wypełniacze ubytków kości, pełniąc rolę szkieletów na których zachodzi odbudowa naturalnej kości, a zarazem dostarczając miejscowo leki. Substancje lecznicze, stopniowo uwalniane z takich implantów, zapewniają niejedno-

Wartość kąta zagięcia Bend angle α , [°]	Potencjał korozyjny Corrosion potential E_{kor} , [mV]	Potencjał transpasywacji Transpassivation potential E_{tr} , [mV]
30	+46 ÷ +50	+810 ÷ +825
60	+58 ÷ +52	+815 ÷ +820
90	+44 ÷ +48	+810 ÷ +820

TABELA 3. Wyniki badań odporności korozyjnej odkształconych próbek ze stopu Co-Cr-W-Ni o powierzchni polerowanej elektrolitycznie i pasywowanej chemicznie.

TABLE 3. Corrosion resistance of deformed Co-Cr-W-Ni samples of electropolished and chemically passivated surface.

Presented investigations are preliminary and need to be continued. The obtained results are promising however further studies, in particular in blood environment, will determine a usefulness of the suggested technique of stents' surface improvement.

Acknowledgements

The work was realized within the confines of the research project PBZ - KBN-082/T08/2002 funded by the Minister of Science and Information Society Technologies.

References

- [4] Norma: ASTM F-746-81:1999. Standard test metod for pitting or crevice corrosion of metallic surgical implant materiale.
- [5] Norma: ASTM G5-94:1999. Standard reference test method for making potentiostatic and potentiodynamic anodic polarization measurements.ukowe Z 243, (1997).

KINETICS OF PENTOXIFYLLINE (PTX) AND DOXYCYCLINE (DOX) RELEASE FROM MODIFIED MULTIFUNCTIONAL HYDROXYAPATITE IMPLANTS

ANETA ZIMA, ANNA ŚLÓSARCZYK, ZOFIA PASZKIEWICZ

AGH-UST UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS
DEPARTMENT OF CERAMIC TECHNOLOGY

Abstract

Release of pentoxifylline (PTX) and doxycycline (DOX) as model drugs from multifunctional modified hydroxyapatite implants has been studied in the work. Such implants can be applied in medicine as bone fillers playing the role of scaffolds on which the regeneration of natural bone as well as local drug delivery take place. Active substances, gradually released from the implants, ensure in many cases more advantageous course of bone treatment process than tradi-

krotnie korzystniejszy przebieg leczenia kości w porównaniu do terapii tradycyjnych. Dzięki nośnikom leków nie jest konieczne obciążanie całego organizmu zbyt dużymi dawkami jak to ma miejsce w przypadku podawania systemowego. Wykazano przydatność opracowanych tworzyw jako implantów wielofunkcyjnych.

Słowa kluczowe: implanty wielofunkcyjne, terapia celowana, nośniki leków.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),99-104]

Wprowadzenie

Problemy jakie napotyka współczesna medycyna w związku z ogólnoustrojowym podawaniem leków to przede wszystkim: ich biodystrybucja w całym organizmie, brak skutecznego działania w miejscu w którym rozwija się stan patologiczny, konieczność zastosowania wysokich dawek umożliwiających osiągnięcie działania terapeutycznego, toksyczne działanie oraz efekty uboczne obejmujące cały organizm. W celu ominięcia tych trudności opracowuje się metody tzw. aktywnego celowania leku. Pod pojęciem tym rozumie się zdolność leku do akumulacji w docelowym, pożądanym organie bądź tkance, przy odpowiednim jego stężeniu terapeutycznym [1,2]. Duże możliwości w tym zakresie stwarzają implanty wielofunkcyjne. Umożliwiają one dostarczenie substancji leczniczej w odpowiedniej dawce i warunkują określoną szybkość jej uwalniania się do otoczenia. Zastosowanie tzw. terapii celowanej pozwala na wyeliminowanie niepożądanych działań ubocznych leku, wynikających z jego obecności w przewodzie pokarmowym przy podaniu doustnym. Dotyczy to zwłaszcza leków, które wpływają niekorzystnie na układ pokarmowy, bądź ulegają szybkiemu metabolizmowi w wątrobie. Poza tym podawanie miejscowe umożliwia uzyskanie pożądanego efektu terapeutycznego przy zastosowaniu niższych dawek niż te, które niezbędne są przy podaniu doustnym, dożylnym bądź domięśniowym (3). Implanty przeznaczone na nośniki leków muszą spełniać szereg wymagań, szczególnie w zakresie porowatości otwartej, całkowitej, wielkości i kształtu porów, składu fazowego oraz parametrów wytrzymałościowych. Wymagany jest system porów otwartych, który pozwala na powolne uwalnianie się zainkorporowanej w nośnik substancji do otaczających tkanek [4]. Odpowiednia wytrzymałość mechaniczna implantów sprawia, że po spełnieniu roli nośnika, stanowią "rusztowanie", na którym zachodzi odbudowa naturalnej kości.

Celem badań była ocena kinetyki uwalniania pentoksyliny (PTX) i doksycykliny (DOX) z kształtek modyfikowanej ceramiki hydroksyapatytowej o różnej mikrostrukturze w warunkach in vitro.

Materiały i metodyka badań

Dla wytworzenia mikroporowatej ceramiki hydroksyapatytowej użyto surowego proszku hydroksyapatytowego $[HAp-Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, zsyntetyzowanego metodą "mokrą" w Laboratorium Bioceramicznym Katedry Technologii Ceramiki na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH. Jako środek porotwórczy użyty został metafosforan wapnia - $Ca(PO_3)_2$ w ilości 5 i 10% mas. oraz uwodniony ortofosforan magnezu - $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ w ilości 10% mas. w stosunku do czystego HAp. Próbkę w kształcie walców o średnicy 11 mm zaprasowano jedoosiowo pod ciśnieniem 20MPa. Temperatury wypalania wynosiły 1150, 1250°C - w przypadku ceramiki HAp z modyfikatorem wapniowym (tworzywo T1/1150, T2/1250) oraz 1250°C - w przypadku ceramiki HAp z dodatkiem $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ (tworzywo T3/

tional therapy. Thanks to drug delivery systems it is not necessary to expose the whole body to high doses as it is the case in systemic administration. Suitability of the materials obtained for application as multifunctional implants has been shown.

Key words: multifunctional implants, target therapy, drug delivery systems.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),99-104]

Introduction

Problems which are encountered by contemporary medicine because of systemic drug administration involve above all: their biodistribution in the whole system, lack of efficient action in the place where the pathology evolves, necessity to apply high doses in order to achieve therapeutic effect, toxic action as well as side effects occurring in the whole system. In order to overcome these difficulties the so-called active drug targeting methods have been worked out. This notion denotes capability of the drug to accumulate in the target, desired organ or tissue in the appropriate, therapeutic concentration [1,2]. Great possibilities in this field are offered by multifunctional implants. They allow to deliver the therapeutic agents in the proper dose and ensure its release to the environment at the appropriate rate. Application of the so-called target therapy makes it possible to eliminate negative side effects caused by the drug resulting from its presence in the alimentary canal after oral administration. This concerns mainly the drugs which have negative influence on alimentary canal or are metabolized fast in the liver. Additionally, local drug administration allows to achieve the desired therapeutic effect at lower doses than would be necessary in oral, intravenous or intramuscular administration [3]. Implants which can be used in drug delivery system have to meet a number of requirements, particularly concerning their open and total porosity, size and shape of pores, phase composition as well as mechanical properties. System of open pores which enables the substance incorporated in the carrier to release slowly into the surrounding tissue is required [4]. The appropriate mechanical strength of the implants ensures that after being the drug carrier they become a scaffold on which natural bone is regenerated.

The goal of the studies has been to determine the kinetics of pentoxifylline (PTX) and doxycycline (DOX) release from the samples of modified hydroxyapatite ceramics exhibiting various microstructure under the in vitro conditions.

Materials and methods

Raw hydroxyapatite powder $[HAp-Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ synthesized by "wet" method in the Bioceramic Laboratory of the Department of Ceramic Technology at Faculty of Materials Science and Ceramics, AGH-University of Science and Technology was used for the preparation of microporous hydroxyapatite ceramics. Calcium metaphosphate $Ca(PO_3)_2$ in the amount of 5 and 10 wt. % or hydrated magnesium orthophosphate $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ in the amount of 10 wt. % were used to generate pores in the materials. Cylindrical samples 11 mm in diameter were uniaxially pressed under the pressure of 20 MPa. Sintering temperatures values were equal to 1150, 1250°C in the case of HAp ceramics containing calcium modifier (materials T1/1150, T2/1250) and 1250°C for HAp ceramics with $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ additive (material T3/1250). In the samples thus prepared holes 4 mm in diameter were made.

Physico-chemical properties of the materials obtained were studied. Phase composition was determined using X-ray

1250). W tak przygotowanych kształtkach wydrążono otwory o średnicy 4 mm.

Określono właściwości fizykochemiczne badanych materiałów. Skład fazowy tworzyw wyznaczono przy pomocy dyfraktometru rentgenowskiego (firmy Seifert FTM) w zakresie kątów 2Q od 10° do 60°. Gęstość pozorną, porowatość otwartą i całkowitą oznaczono metodą ważenia hydrostatycznego. Wytrzymałość mechaniczną na ściskanie zmierzono przy użyciu maszyny wytrzymałościowej Tira-test, zaś na zginanie za pomocą maszyny wytrzymałościowej firmy Zwick. Rozkład wielkości porów ustalono w oparciu o wyniki porozymetrii rtęciowej (porozymetr 2000 Carlo Erba Instruments). Ocenę mikrostruktury przeprowadzono przy użyciu mikroskopu skaningowego (Jeol 5400).

Do badań kinetyki uwalniania leków użyto walców wypełnianych 50 mg PTX lub DOX, a następnie uszczelnionych woskiem Bone Wax firmy Ethicon. Tak przygotowane kształtki umieszczano w kolbach zawierających po 50 ml buforu fosforanowego o pH=7,4. Badania wykonano w termostatowanej łaźni wodnej z wytrząsaniem z częstotliwością 60 ruchów/min., w temperaturze 37°C. W określonych odstępach czasu z kolbek pobierano za pomocą pipety 3 ml próbki, uzupełniając następnie pozostały w kolbach roztwór buforem fosforanowym do stałej objętości 50 ml. Stężenie PTX i DOX w pobranych próbkach oznaczano metodą spektrofotometryczną, z detekcją UV przy analitycznej długości fali 275 nm dla PTX i 272 nm dla DOX.

PTX o nazwie chemicznej 3,7 dihydro-3,7dimetylo-1(5-oksoheksylo)-1H-puryno-2,6 dion jest substancją bardzo dobrze rozpuszczalną w wodzie, w badanym środowisku o pH=7.4 nieznacznie zjonizowaną. Zastosowano ją jako lek modelowy, kierując się doniesieniami literaturowymi wskazującymi na możliwość wykorzystania PTX w leczeniu złamań kości długich i osteoporozy [5].

Doksycyklina (DOX) 6-deoksy-5-hydroksy-tetracyklina jest półsyntetycznym antybiotykiem z grupy tetracyklin, słabo rozpuszczalnym w wodzie. Zaliczana jest do nowej generacji leków o szerokim zakresie działania bakteriostatycznego i przedłużonym czasie działania. W badaniach została wykorzystana jako lek modelowy z możliwością potencjalnego zastosowania w zakażeniach bakteryjnych kości.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań właściwości fizykochemicznych modyfikowanych tworzyw hydroksyapatytowych przedstawione zostały w TABELI 1. Zastosowane w pracy sposoby modyfikacji bioceramiki HAp dodatkami zarówno $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ jak i $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ pozwoliły uzyskać mikroporowatą ceramikę hydroksyapatytową o zróżnicowanej mikrostrukturze. Badane tworzywa charakteryzowały się porowatością otwartą i całkowitą w granicach 25-40%. Zbliżone wartości obu rodzajów porowatości dla każdego tworzywa świadczą o znikomym udziale w nich porów zamkniętych. Pory wykazywały rozkład jednomodalny, a ich rozmiar mieścił się w granicach od 0,5 do 5 μm . W składzie fazowym poszczególnych spieków oprócz faz hydroksyapatytu (HAp) i whitlockitu (βTCP) wystąpił również $(\text{Ca,Mg})_3(\text{PO}_4)_4$, czyli βTCP z podstawieniami magnezu w miejsce wapnia oraz w tworzywie T3/1250 obecne były niewielkie ilości MgO . Kształtki wykazywały zadowalającą, dla tego typu potencjalnych aplikacji medycznych, wytrzymałość mechaniczną. Różnice w zakresie mikrostruktury badanych tworzyw implantacyjnych (RYS.1-3) były powodem różnej kinetyki uwalniania się zainkorporowanych w nich leków.

Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano istnienie różnic w zakresie szybkości i ilości uwalniającej się pentoksyliny z poszczególnych implantów. W przypadku two-

dyfractometer (produced by Seifert FTM) in the 2Q range of 10° to 60°. Apparent density, open and total porosity were determined by hydrostatic weighing method. Compression strength was measured using Tira-test apparatus, whereas bending strength - with the aid of Zwick equipment. Pore size distribution was established based on the results obtained by mercury porosimetry (2000 Carlo Erba Instruments porosimeter). Microstructure was analysed using scanning electron microscope (Jeol 5400).

For the studies of drug release, cylinders filled with 50 mg of PTX or DOX sealed with Bone Wax produced by Ethicon were used. Such samples were placed in flasks containing 50 ml of phosphate buffer (pH=7,4). The studies were carried out in thermostated water bath which was shaken at frequency of 60 moves/min. at the temperature of 37°C. At selected time intervals 3 ml samples were withdrawn by a pipette from the flasks with simultaneous addition of phosphate buffer to the flasks so that the volume of their contents was always constant and equal to 50 ml. Concentration of PTX and DOX in the aliquots was determined spectrophotometrically at the analytical wavelength of 275 nm for PTX and 272 nm for DOX.

PTX, whose chemical name is 3,7-dihydro-3,7-dimethyl-1(5-oxohexyl)-1H-purine-2,6-dion, dissolves very well in water; in the medium of pH=7.4 it is slightly ionized. It was selected as model drug for the studies since there are reports in the literature that it can be used for the treatment of breaks of long bones as well as osteoporosis [5].

Doxycycline (DOX), i.e. 6-deoxy-5-hydroxy-tetracycline is a semi-synthetic antibiotic belonging to the group of tetracyclines, poorly soluble in water. It belongs to the new generation of drugs showing wide spectrum of bacteriostatic and sustained action. In the present studies it was used as the model drug which can be potentially applied for the treatment of bacterial bone infections.

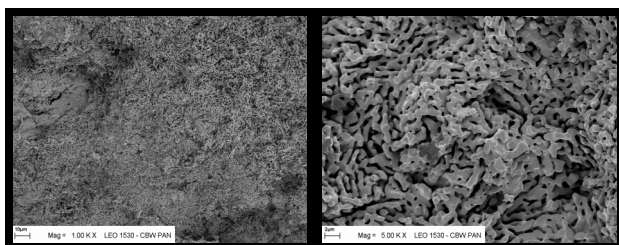
Results and discussion

Results of the studies of physico-chemical properties of modified hydroxyapatite materials are presented in TABLE 1. The methods used in the work to modify HAp bioceramics with both $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ and $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ made it possible to obtain microporous hydroxyapatite ceramics of various microstructures. The materials studied exhibited open and total porosity in the range of 25-40%. Close values of both types of porosities prove negligible proportion of closed pores in the materials. Pores showed unimodal distribution, their size was in the range between 0.5 and 5 μm . In the phase composition of individual sinters, apart from hydroxyapatite (HAp) and whitlockite (βTCP) phases, $(\text{Ca,Mg})_3(\text{PO}_4)_4$,

Parametry fizykochemiczne tworzyw	Rodzaj modyfikatora		
	Modyfikator wapniowy $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ [%mas.]	Modyfikator magnezowy $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ [%mas.]	
	5	10	10
	T1/1150	T2/1250	T3/1250
Porowatość całkowita [%]	39,4	25,3	31,7
Porowatość otwarta [%]	39,0	25,2	30,7
Skład fazowy	HAp+ βTCP	βTCP	HAp+($\text{Ca,Mg})_3(\text{PO}_4)_4$ +MgO
Zakres porów [μm]	0,2-3,0	1-4	0,3-2,0
Wytrzymałość na ściskanie [MPa]	28,8±10,5	27,4±4,4	77,4±7,4
Wytrzymałość na zginanie [MPa]	19,6±2,1	13,0±1,1	24,5±8,7

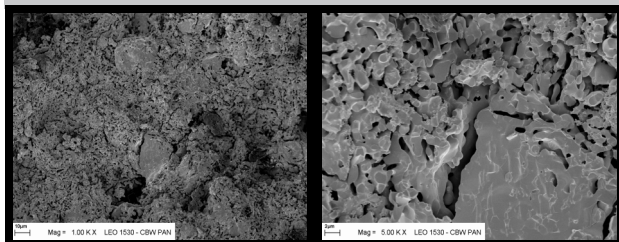
TABELA 1. Właściwości fizykochemiczne badanych tworzyw.

TABLE 1. Physicochemical properties of the investigated materials.



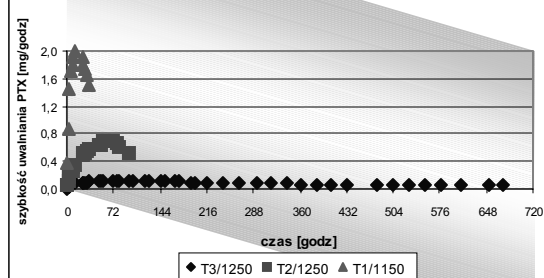
RYS. 1. Obraz mikroskopowy tworzywa HAp z 5% mas. dodatkiem $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ po wypaleniu w temperaturze 1150°C . a) pow.1000x, b) pow. 5000x.

FIG. 1. Microstructure of the HAp material with 5 wt% addition of $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ after sintering at 1150°C , a) magn.1000x, b) magn. 5000x.



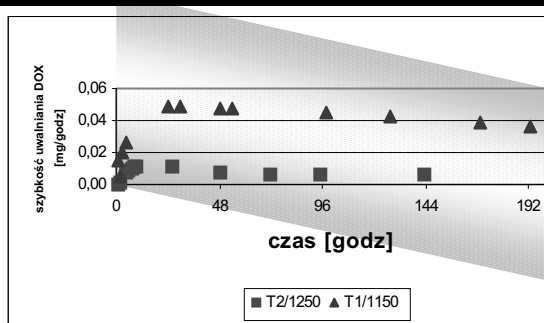
RYS. 3. Obraz mikroskopowy tworzywa HAp z 10% mas. dodatkiem $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ po wypaleniu w temperaturze 1250°C , a) pow.1000x, b) pow.5000x.

FIG. 3. Microstructure of the HAp material with 10 wt% addition of $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ after sintering at 1250°C , a) magn.1000x, b) magn. 5000x.



RYS. 5. Szybkość uwalniania pentoksyfiliny [mg/godz] w warunkach in vitro.

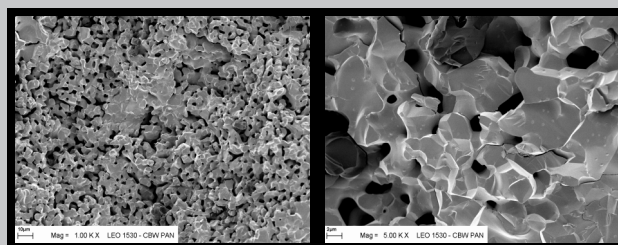
FIG. 5. PTX released rate [mg/h] versus time (in vitro study).



RYS. 7. Szybkość uwalniania doksyacyliny [mg/godz] w warunkach in vitro.

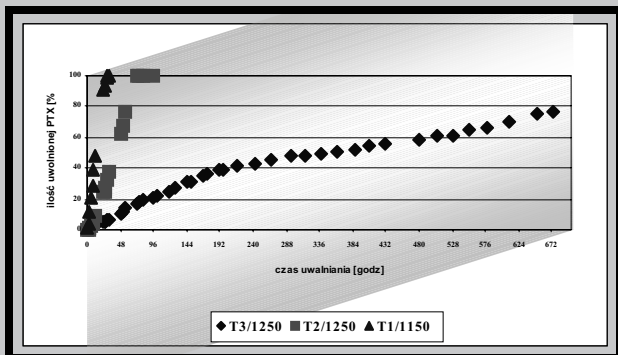
FIG. 7. DOX released rate [mg/h] versus time (in vitro study).

rzyw T1/1150 i T2/1250 odnotowano całkowite uwolnienie zawartej w nośnikach substancji leczniczej do buforu, przy czym proces ten nastąpił w różnym czasie (RYS.4). Tworzywo T1/1150 z 5%mas. dodatkiem modyfikatora wapniowego uwolniło 100% PTX w ciągu 24h, co jest czasem zbyt



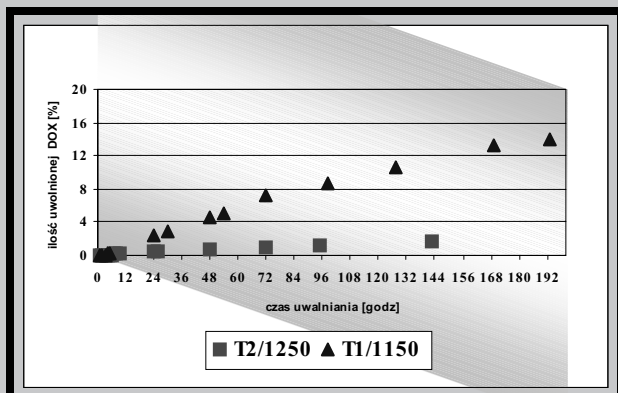
RYS. 2 Obraz mikroskopowy tworzywa HAp z 10% mas. dodatkiem $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ po wypaleniu w temperaturze 1250°C , a) pow.1000x, b) pow.5000x.

FIG. 2. Microstructure of the HAp material with 10 wt% addition of $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$ after sintering at 1250°C , a) magn.1000x, b) magn.5000x.



RYS. 4. Ilość uwolnionej pentoksyfiliny w [%] z implantów hydroksyapatytowych.

FIG. 4. Amount of released PTX [%] versus time from the hydroxyapatite implants.



RYS. 6. Ilość uwolnionej doksyacyliny w [%] z implantów hydroksyapatytowych.

FIG. 6. Amount of released DOX [%] versus time from the hydroxyapatite implants.

i.e. βTCP with substitutions of magnesium for calcium and in the T3/1250 material small amounts of MgO were present. Samples showed mechanical strength sufficient for potential medical applications of this type. Differences in the microstructure of the studied implant materials (FIG.1-3) resulted in different kinetics of release of drugs incorporated in them. Based on the investigations performed differences in the rate and amount of pentoxifylline released from individual implants were revealed. Thus, in the case of T1/1150 and T2/1250 materials total release of the drug into the buffer was observed, but this process occurred after different time for various carriers (FIG.4). T1/1150 material containing 5 wt. % of calcium modifier released 100% of PTX after 24h, which is too fast for the drug to affect efficiently the damaged or infected bone tissue in a living body. 100% of PTX was released from T2/1250 material after 72h. Thus, this material can be used in the prophylactic therapy, prevent-

krótkim, aby środek ten mógł efektywnie oddziaływać na uszkodzone lub chore tkanki kostne w żywym organizmie. Czas uwalniania 100% PTX z tworzywa T2/1250 wynosił 72h. Tworzywo to może zostać uznane za potencjalnie możliwe do wykorzystania w terapii profilaktycznej, zapobiegającej powikłaniom zakaźniowym po implantacji. Maksymalna szybkość uwalniania PTX z tego tworzywa wynosiła 0,7 mg/godz. (RYS.5). Najkorzystniejszym profilem uwalniania PTX odznaczało się tworzywo T3/1250 modyfikowane 10% mas. dodatkiem $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$. W jego przypadku czas uwalniania 80% leku wynosił 31 dni zaś szybkość uwalniania w tym okresie utrzymywała się na poziomie 0,12-0,07 mg/godz. (RYS.5). Tworzywo to odznaczało się porowatością całkowitą ~ 31,7% i rozmiarem porów 0,3-2 μm oraz najwyższą wśród badanych wytrzymałością mechaniczną (TABELA 1).

Do badań kinetyki uwalniania doksycykliny wytypowano tworzywa T1/1150 oraz T2/1250. Z analizy krzywych przedstawionych na rys.6 wynika, że tworzywa te uwalniają DOX znacznie słabiej niż pentoksylinę. Związane jest to z właściwościami farmakokinetycznymi i fizykochemicznymi doksycykliny (słaba rozpuszczalność i duża masa cząsteczkowa). W przypadku tworzywa T2/1250 odnotowano znikome uwalnianie się DOX wynoszące po 6 dniach zaledwie 2%, przy bardzo niskiej szybkości tego procesu (0,01-0,005 mg/godz. - proces zerowego rzędu). Tworzywo T1/1150 pomimo najwyższej wśród badanych materiałów porowatości otwartej również nie wykazało się zadowalającą kinetyką uwalniania doksycykliny. Maksymalna szybkość uwalniania kształtowała się na poziomie 0,05 mg/godz. (RYS.7).

Podsumowanie

Opracowano mikroporowatą bioceramikę hydroksyapatytowo-whitlockitową w oparciu o hydroksyapatyt modyfikowany dodatkami $Ca(PO_3)_2$ i $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$. Biorąc pod uwagę ilość uwolnionego leku stwierdzono, że nośniki wytworzone z modyfikowanej ceramiki HAp w warunkach in vitro bardzo dobrze uwalniały pentoksylinę (80-100%), znacznie gorzej zaś doksycyklinę (2-15%). Wykazano, że proces uwalniania leków z ceramicznych implantów wielofunkcyjnych zależy w dużej mierze od mikrostruktury tworzyw jak i od cech farmakokinetycznych stosowanych leków [6]. Dlatego też, co potwierdziły badania, nie jest możliwe opracowanie jednego rodzaju tworzywa, które mogłoby służyć jako modelowe do uwalniania różnych rodzajów leków. Stała i utrzymująca się przez okres jednego miesiąca na poziomie ~ 0,1 [mg/godz] szybkość uwalniania PTX z implantu T3/1250 pozwala uznać ten typ mikrostruktury za korzystny w przypadku długoterminowego leczenia terapeutycznego. Odpowiednia mikrostruktura, nie budzący zastrzeżeń skład fazowy, zadowalająca wytrzymałość mechaniczna oraz korzystny profil uwalniania pentoksyliny z nośników HAp modyfikowanych 10% mas. dodatkiem $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ pozwalają przypuszczać, że tworzywo to może być wykorzystane do wytwarzania implantów wielofunkcyjnych.

Podziękowania

Praca wykonana w ramach projektu zamawianego Nr PBZ-KBN-082/T08/26, finansowanego przez Ministra Nauki i Informatyzacji.

ing from infections after implantation. Maximum release rate from this material was equal to 0.7 mg/h (FIG.5). The T3/1250 material modified with 10 wt. % of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ showed the most advantageous release profile. In this case the time of release of 80% of drug was equal to 31 days and the rate of release during this period of time stayed at the level of 0.12-0.07 mg/h (FIG.5). This material exhibited the total porosity of ~31.7%, size of pores 0.3-2 μm and the highest of the materials studied mechanical strength (TABLE 1).

To investigations the kinetics of doxycycline release the T1/1150 and T2/1250 materials were selected. If the curves presented in FIG.6 are analysed it is seen that the release of DOX from these materials is significantly less efficient than that of PTX. This is connected with pharmacokinetic and physico-chemical properties of doxycycline (poor solubility in water and high molecular weight). In the case of T2/1250 material negligible release of DOX was observed: only 2% after 6 days at very low rate (0.01-0.005 mg/h - zero-order process). T1/1150 material, even though it exhibited the highest open porosity among the materials studied, did not show the satisfactory kinetics of doxycycline release. Maximum release rate was equal to 0.05 mg/h in this case (FIG.7).

Summary

Microporous hydroxyapatite-whitlockite bioceramics based on hydroxyapatite modified with $Ca(PO_3)_2$ and $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ has been worked out. Taking into account the amount of the drug released it was found that in vitro conditions the carriers formed by modified hydroxyapatite ceramics have released pentoxifylline very well (80-100%) but doxycycline significantly worse (2-15%). It has been shown that the process of drug release from multifunctional ceramic implants depends to a significant degree on the microstructure of the materials, but also on the pharmacokinetic properties of the drugs applied [6]. Therefore, as the studies have confirmed, it is not possible to work out one type of the material which could serve as the model for the release of various drugs. Constant and staying for one month at the level of ~ 0.1 [mg/h] release rate of PTX from T3/1250 implant allows to consider this type of microstructure as advantageous for long-term therapy. Appropriate microstructure, non-controversial phase composition, satisfactory mechanical strength as well as advantageous PTX release profile from HAp modified with 10 wt. % of $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ carriers make it possible to suppose that this material can be applied to produce multifunctional implants.

Acknowledgements

The work was carried out within the project No PBZ-KBN-082/T08/26 financed by the Minister of Science and Information Society Technologies.

- [1] Torchilin V.P.: Drug Targeting, European Journal Of Pharmaceutica Science 11 suppl.2 (2000) 81-91.
 [2] Dash A.K., Cudworth G.C.: Therapeutic Applications of Implantable Drug Delivery Systems, Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 40 (1998) 1-12.
 [3] Dittigen M.: Transdermalne systemy terapeutyczne. Technologia nowoczesnych postaci leków., Wyd. PZWL, Warszawa (1998) 120-147.

WPŁYW KOPOLIMERU P(LLA/GLA) WZMACNIANEGO WŁÓKNAMI WĘGLOWYMI NA GOJENIE RAN KOSTNYCH ŻUCHWY KRÓLIKÓW

MAGDALENA CIEŚLIK*, DANIEL SABAT**, AGATA CIEŚLIK-BIELECKA***, MAREK ADWENT***, GRZEGORZ BAJOR****, TADEUSZ CIEŚLIK***, MONIKA WYSOCZAŃSKA***

*ZAKŁAD MATERIAŁOZNAWSTWA STOMATOLOGICZNEGO ŚAM, BYTOM

**KATEDRA I ZAKŁAD PATOMORFOLOGII ŚAM, ZABRZE

***I KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ ŚAM, ZABRZE

****KATEDRA CHIRURGII DZIECIĘCEJ ŚAM, BYTOM

Streszczenie

Praca miała na celu ocenę kompozytu otrzymanego z biodegradowalnego kopolimeru glikolidu z laktidem wzmocnionego włóknami węglowymi w warunkach dotkankowej implantacji. Wykonano badania na zwierzętach, a uzyskane wyniki poddano ocenie klinicznej, radiologicznej i histopatologicznej. Uzyskane wyniki badań wykazały, iż badany materiał nie wywołuje negatywnych odczynów miejscowych i ogólnoustrojowych, a najbardziej aktywny proces odnowy tkanki kostnej następuje między 14 a 21 dobą, natomiast mineralizacji pomiędzy 6 a 12 tygodniem obserwacji. Ponadto dodane do kopolimeru włókna węglowe wpływają na przyspieszenie odnowy tkanki kostnej w porównaniu z jego czystą postacią.

Słowa kluczowe: biomateriały, polimery biodegradowalne, kopolimer P(LLA/GLA), włókna węglowe, regeneracja tkanki kostnej, badania na zwierzętach.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),104-107]

Wprowadzenie

Ze względu na dobrą biogodność poliglikolidu i jego kopolimerów obserwuje się ciągły wzrost zainteresowania tymi materiałami w codziennej praktyce klinicznej [1,2,3,4]. Wytworza się z nich biodegradowalne implanty w postaci śrub, płytek czy gwoździ chirurgicznych jak i zaopatruje się nimi uszkodzenia niektórych organów wewnętrznych [5,6,7,8,9,10]. Kopolimery glikolidu z laktidem stosowane są również często jako nośniki leków w procesach ich kontrolowanego uwalniania czy w inżynierii tkankowej jako podłoża dla nowo powstających tkanek [11,12,13,14]. Są one ponadto typowymi materiałami termoplastycznymi dzięki czemu możliwe jest wytwarzanie z nich metodami wtrysku czy wytłaczania wyrobów przeznaczonych dla medycyny.

References

- [4] De Groot K.: Effect of porosity and physical-chemical properties on the stability, resorption and strength of calcium phosphate ceramics, Biomaterials, (1988).
 [5] Paradowski T., Zeman K.: Pentoksylina, Post. Hig. Med. Dośw. 49 (1995) 201-220.
 [6] Szymura-Oleksiak J., Ślósarczyk A., Mycek B., Witek J., Kurek E., Paszkiewicz Z., Szklarczyk S.: Badanie kinetyki uwalniania leków z implantów hydroksyapatytowych, Ceramics 71 (2002) 365-371.

INFLUENCE OF LACTIDE-GLYCOLIDE CO-POLIMER REINFORCED BY CARBON FIBERS ON RABBITS MANDIBLE OSSEOUS WOUNDS HEALING

MAGDALENA CIEŚLIK*, DANIEL SABAT**, AGATA CIEŚLIK-BIELECKA***, MAREK ADWENT***, GRZEGORZ BAJOR****, TADEUSZ CIEŚLIK***, MONIKA WYSOCZAŃSKA***

*DEPARTMENT & SECTION OF STOMATOLOGICAL MATERIALS SCIENCE OF SILESIA MEDICAL ACADEMY, BYTOM

**DEPARTMENT OF PATHOMORFOLOGY OF SILESIA MEDICAL ACADEMY, ZABRZE

***I DEPARTMENT AND CLINIC OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY OF SILESIA MEDICAL ACADEMY, ZABRZE

****DEPARTMENT OF CHILDREN SURGERY OF SILESIA MEDICAL ACADEMY, BYTOM

Abstract

The main purpose of this investigation was estimation of some biological properties of biodegradable lactide-glycolide co-polymer reinforced by carbon fibres. The results of the research subjected to clinical, radiological and histopathological estimation. The tested material caused lack of local and general negative reactions, the most active process of osseous tissue regeneration was between 14 and 21 day, however the most mineralization was between 6 and 12 week of observation. Besides added to co-polymer carbon fibres influence on acceleration of osseous tissue regeneration compared to its pure form.

Keywords: biomaterials, biodegradable polymers, lactide-glycolide co-polymer, carbon fibres, osseous tissue regeneration, experiments on animals

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),104-107]

Introduction

Good biocompatibility of polyglycolide and its co-polymers is the reason of the observed growing interest in these materials in clinical practice [1,2,3,4]. They are used as biodegradable implants shaped into screws, plates or surgical nails and also as dressing for the wounds of some internal organs [5,6,7,8,9,10]. The glycolide-lactide co-polymers are also often used as drug carriers for a controlled drug release or as the scaffolds in tissue engineering [11, 12, 13, 14]. Besides they are typical thermoplastic materials and therefore it is possible to shape them by injection moulding to obtain the articles for medical applications. However, they have relatively low mechanical parameters, which essen-

Jednakże kopolimery te posiadają stosunkowo słabe parametry mechaniczne, co w zasadzie ogranicza zakres ich stosowania w medycynie do przypadków, gdzie nie muszą przenosić znacznych obciążeń [9,15]. Dlatego optymalną drogą poprawy ich właściwości mechanicznych wydaje się zbrojenie ich włóknami syntetycznymi, takimi jak przykładowo włókna węglowe [3,16].

W pracy dokonano oceny niektórych właściwości biologicznych kompozytu otrzymanego z kopolimeru glikolidu z laktydem wzmocnionego włóknami węglowymi - P(LLA/GLA)+CF. W tym celu wykonano badania na zwierzętach, a wyniki poddano ocenie klinicznej, radiologicznej i histopatologicznej. Na podstawie badań analizowano: 1.Czy kopolimer P(LLA/GLA)+CF wywołuje niekorzystne miejscowe czy też ogólnoustrojowe odczyny tkankowe? 2.W jakich okresach badawczych dochodziło do najbardziej aktywnego procesu odbudowy kości i mineralizacji tkanki kostnej? 3.Czy dodanie do kopolimeru P(LLA/GLA) włókien węglowych wpływa na spowolnienie czy też przyspieszenie odnowy tkanki kostnej w porównaniu z grupą kontrolną?

Material i metody

W pracy zastosowano kompozyt otrzymany z kopolimeru glikolidu z laktydem (18:82) wzmocnionego włóknami węglowymi o długości 3 mm. Udział objętościowy włókien wynosił 15%. Syntezę kopolimeru prowadzono stosując jako inicjator związek o stosunkowo niskiej toksyczności - acetyloacetonian cyrkonu [17].

Do badań doświadczalnych na 24 królikach (mieszańce różnej płci o wadze od 2600 - 3200 gramów) użyto materiał w postaci walców o średnicy 3,2 mm.

Podczas operacji zastosowano znieczulenie ogólne (premedykacja - Diazepam i Atropina, znieczulenie - Ketamina).

Wykonane w jednej połowie żuchwy królików ubytki kostne wypełniono kopolimerem glikolidu z laktydem (grupa kontrolna), a w drugiej połowie jego kompozytem z włóknami węglowymi (grupa badana). Na grzbiecie zwierząt wzdłuż kręgosłupa lędźwiowego wykonano nacięcia skóry. Po lewej stronie kręgosłupa pod skórą wytworzono kieszeń, po prawej natomiast rozwarstwiono mięśnie grzbietu. W tak przygotowane miejsca wprowadzono oba materiały. Rany po obu stronach zaszywano warstwowo "Dexonem".

U wszystkich zwierząt wykonywano obserwacje kliniczne przebiegu gojenia ran, a po ich zabiciu badania radiologiczne w 7, 14 i 21 dobie, oraz w 6, 12, 24 tygodniu doświadczenia, a także badania histopatologiczne poszerzone dodatkowo o jeden okres badawczy tj. 48 tydzień obserwacji, w których oceniano tkankę kostną w miejscu wykonywanych ubytków i z otoczenia, ponadto tkankę podskórną i mięśniową z okolic kręgosłupa lędźwiowego. Badano również narządy wewnętrzne zwierząt doświadczalnych (wątrobę i nerki).

Wyniki i dyskusja

Badania kliniczne wykazały prawidłowe gojenie się ran pooperacyjnych. Nie stwierdzono odczynów zapalnych czy też objawów chęłbotania (brak krwiaka lub też obfitej wydzieliny przyrannej). Gojenie ran przebiegało przez rychłozrost i uległo zakończeniu między 10-14 dniem doświadczenia (usuwanie szwów). Mierne zgrubienia tkanek (głównie skóry i tkanki podskórnej) były niedostrzegalne od 21 doby doświadczenia. Przez cały okres badań obserwowano stały przyrost masy ciała królików.

Badania radiologiczne w 7 dobie wykazały w obu grupach obecność kulistego przejaśnienia o regularnych brzegach

tially limits the applications to the regions where it is not necessary that they bear significant loads [9,15]. It seems that reinforcement with some synthetic fibres like carbon fibres might greatly improve their mechanical properties [3,16].

In the work it was estimated some biological properties of biodegradable lactide-glycolide co-polymer reinforced by carbon fibres - P(LLA/GLA)+CF. For that purpose it was carried out research on animals which next was subjected to clinical, radiological and histopathological estimation. On the basis of received results firstly it was analyzed: 1.Does the lactide-glycolide co-polymer call out local or general negative tissue reactions? 2.In which research periods the most active process of bone reconstruction and osseous tissue mineralization was observed? 3.Does the addition of carbon fibres to co-polymer P(LLA/GLA) influence on acceleration or slowdown of osseous tissue regeneration compared to control group?

Material and methods

In this work it was used composite obtained from a lactide-glycolide (18:82) co-polymer reinforced by 3 mm long carbon fibres. The volume fraction of carbon fibres in the composite was 15%. The synthesis of co-polymer was done by use to without any toxic additives a new initiator - acetylacetonate zirconium [17].

The experimental study was performed on 24 rabbits (both sex and weight between 2600-3200 g.) and the using material was in 3,2 mm diameter cylinder state.

During the surgery all animals received diazepam and atropine premedication and then were anaesthetized with ketamine.

In the first stage of surgery bilateral incision over mandible corpus was made and the bone was exposed. The canal in the bone on the both flanks was made with 3,2 mm diameter bur. Then the canal at the one side was filled with glycolide-lactide co-polymer (control group) and at the other side its composite with carbon fibres (experimental group). In the second stage of surgery under skin on the left side of backbone was made pocket however on the right side separated the muscles of the back. Implants were placed in the both holes. In the all cases Dextron was used to wounds suture.

For all animals clinical examination and then (after the rabbits were killed) radiological investigations were performed in 1, 2, 3, 6, 12 and 24 week of examination and additionally elongated about one period (48 week of examination) histopathological investigations were performed, too. The osseous tissue which was situated in and around of bone defects, subcutaneous and muscular tissue from area of lumbar backbone were estimated during the histopathological investigations. It was investigated internal organs (kidney and liver) of the animals, too.

Results and discussion

The clinical researches proved properly healing of the post surgical wounds. There weren't noticed neither any inflammatory reactions nor fluctuation symptoms (lack of hematoma or plentiful wound secretion). It was observed the healing surgical wounds by first intention and came to an end between 10 and 14 day of examination (time of sutures removal). The mediocre pachyderma was observed to 21 day of experiment. For all periods of experiment it was observed changeless weight gain of the rabbits.

In 7 day of experiment in the both groups the radiological study showed existence of round alight with regular border

odpowiadającego wielkością wykonanemu ubytkowi kostnemu. W późniejszych okresach przejaśnienie ulegało stopniowemu zmniejszeniu przybierając nieregularną postać. W grupie badanej było ono widoczne w postaci drobnych punkcików, przeważały jednak wyspowate cienie. W 24 tygodniu ubytek kostny wypełniony był już mocno zmineralizowaną tkanką, co widoczne było w postaci zaznaczonego na obrazach rentgenowskich zacielenia.

W początkowych okresach badań histopatologicznych widoczny był wyraźnie uformowany ubytek pokryty młodą tkanką łączną włóknistą z cechami aktywnej odbudowy tkanki kostnej pod postacią licznych pasm młodych, niedojrzałych beleczek kostnych obrzeżonych osteoblastami. Obserwowano także martwicze resztki tkanki kostnej otoczone osteoklastami, a w grupie badanej pojedyncze włókna węglowe umiejscowione na dnie ubytku. W 21 dobie w grupie kontrolnej aktywność osteoblastyczną obserwowano w niektórych beleczkach kostnych (w innych kość wykazywała cechy dojrzałości), a w grupie badanej jedynie w znajdującej się głębiej tkance łącznej włóknistej. Po 6 i 12 tygodniach doświadczenia kanał wszczepu pokryty był dojrzałą tkanką łączną włóknistą z obecnymi w niej beleczkami kostnymi bez cech aktywności osteoblastycznej. Jedynie w dnie obecne były jeszcze na powierzchni beleczek kostnych nieliczne osteoblasty. W świetle kanału, po usunięciu wszczepu, pozostały liczne fragmenty włókien węglowych i mgiełkowate złogi matrycy polimerowej. Po 24 i 48 tygodniach badań kanał wszczepu został całkowicie wypełniony przez rozrastającą się tkankę kostną, która nie wykazywała już cech aktywności osteoblastycznej.

W tkance podskórnej po tygodniu obserwacji wszczep otoczony był cienką torebką łącznotkankową z widocznymi miejscami fragmentami włókien węglowych po usunięciu wszczepie. W późniejszym okresie torebka łącznotkankowa stała się pogrubiała, a na jej powierzchni obecne były jednojądrowe komórki fagocytarne, czasami zlewające się i tworzące komórki olbrzymie wielojądrowe. Fragmenty włókien węglowych i badanego materiału otoczone były przez makrofagi tworzące drobne ziarniniaki typu "około ciała obcego". Torebka łącznotkankowa zbudowana była głównie z włókien kolagenowych i nielicznych makrofagów. W niektórych miejscach wokół torebki obserwowano cechy tworzenia się blizny łącznotkankowej i regeneracji uszkodzonych włókien mięśniowych. W ostatnim okresie obserwacji wszczepiony materiał w całości przerosnięty był tkanką łączną włóknistą z obecnymi w niej naczyniami włosowatymi i komórkami olbrzymimi wielojądrowymi. Złogi matrycy polimerowej nie były już widoczne, a w otaczającej wszczep tkance nie występował odczyn zapalny.

Początkowa obserwacja tkanki mięśniowej wokół wszczepu wykazała obecność młodej tkanki łącznej włóknistej z bogatą siecią włosowatych naczyń krwionośnych wnikać pomiędzy uszkodzone włókna mięśni poprzecznie prążkowanych. W dalszym etapie w tkance włóknistej pojawiły się włókna kolagenowe, a w tkankach poza wszczepem nieliczne olbrzymiokomórkowe ziarniniaki typu "około ciała obcego" wytworzone wokół luźnych fragmentów włókien węglowych. Wokół wszczepu wytworzyła się gruba bliznowaciejąca torebka łącznotkankowa zbudowana z włókien kolagenowych i fibroblastów. Na obwodzie zmian widoczne były cechy regeneracji włókien mięśniowych z pomnożeniem jąder komórkowych. W ostatnim okresie badawczym wszczepiony materiał był wyraźnie odgraniczony od tkanki mięśniowej i przerosnięty w całości przez tkankę włóknistą. W badanych narządach wewnętrznych (nerki i wątroba) nie wykazano żadnych zmian patologicznych związanych z zastosowanymi wszczepami.

which dimension was such as the bone defect. In next periods the alight gradually decreased and took on irregular shape. In experimental group this alight was observed in shape of small points, there were a lot of local shades. In 24 week the bone defect was already filled with intensively mineralized tissue what was observed in shape of marked shade on the X-ray pictures.

In the initial periods of the histopathological investigations it was observed the bone defect covered with young fibrous tissue with features of active osseous tissue reconstruction assuming shape of numerous bands of young and immature osseous trabeculas which were surrounded with osteoblasts. Besides there were necrotic leavings of osseous tissue what was surrounded with osteoclasts. In experimental group there were the single carbon fibers on the bottom of defect. In 21 day in the control group osteoblasts were in some osseous trabeculas (in others the bone was mature) and in the experimental group they were only situated in the deeper lying fibrous tissue. After 6 and 12 weeks of experiment the bone defect was covered with mature fibrous tissue with deprived of osteoblasts osseous trabeculas. Pure and simple there are some osseous trabeculas with osteoblasts in the bottom of the bone defect. There are numerous scraps of carbon fibres and polymer matrix in the place where the graft was removed from. After 24 and 48 weeks of investigations growing osseous tissue without any osteoblasts filled completely the bone defect.

After one week of observation in the subcutaneous tissue a graft was surrounded with a connective tissue capsule with some carbon fibres which were remained during removal of the graft. In later period a connective tissue capsule became thicker and there were onenuclear phagocytic cells on its surface, which sometimes blended and created giant multinuclear cells. The scraps of carbon fibres and polymer matrix were surrounded with macrophages which created small foreign body granulomas. The connective tissue capsule was mainly built of collagenic fibres and a few macrophages. In the some places, around capsule, a connective tissue scar and regeneration of damaged muscle fibres was observed. In the last period of observations the tested material was completely covered with fibrous tissue with the capillary vessels and giant multinuclear cells. It wasn't observed any fragments of polymer matrix and inflammatory reactions in the tissue surrounding the graft.

The initial observations of muscle tissue showed a young fibrous tissue with a lot of capillary blood vessels which was getting in damaged fibres of skeletal muscles. In next period in the fibrous tissue a collagenic fibres were observed. Besides there were surrounding the scraps of carbon fibres the gigantocellular foreign body granulomas in tissue out of graft. It was shown a thick cicatricial connective tissue capsule which was built with collagenic fibres and fibroblasts. Besides it was observed features of muscle fibres regeneration in conjunction with multiplication of nucleuses on the border of the changes. In the last period of observations the tested material was definite separated from the muscle tissue and completely covered with the fibrous tissue.

The histopathological evaluation of kidney and liver did not demonstrate any pathological changes.

Conclusion

The tested co-polymer P(LLA/GLA)+CF caused lack of local and general negative reactions - it dealt with subcutaneous, muscle and osseous tissue.

In vivo biological researches showed that the most active process of osseous tissue regeneration was between 14

Podsumowanie

Wszczepiony dotkankowo kopolimer P(LLA/GLA)+CF nie wywołuje negatywnych odczynów miejscowych i ogólnoustrojowych - dotyczy to zarówno tkanki podskórnej, mięśniowej jak i kostnej.

Przeprowadzone w warunkach in vivo badania biologiczne wykazują, iż najbardziej aktywny proces odnowy tkanki kostnej następuje między 14 a 21 dobą, a mineralizacji pomiędzy 6 a 12 tygodniem obserwacji.

Kopolimer P(LLA/GLA)+CF wyraźnie powodował przyspieszenie odnowy tkanki kostnej w porównaniu z grupą kontrolną.

Piśmiennictwo

- [1] Bajor G., Adwent M., Cieślak-Bielecka A., Starzak P., Proszek M., Chłopek J., Sabat D., Cieślak T.: Wczesny okres obserwacji bioresorbowalnego kompozytu kopolimeru P(LLA/GLA) wprowadzonego w kość udową królika - badania doświadczalne. Inż. Biomat., 2004, 38-42, 228-231.
- [2] Bajor G., Adwent M., Cieślak-Bielecka A., Starzak P., Proszek M., Sabat D., Cieślak T.: Sześciotygodniowy okres obserwacji wszczepów P(LLA/GLA)+CF wprowadzonych w kość udową królika. Inż. Biomat., 2004, 38-42, 231-234.
- [3] Proszek M.: Gojenie ran kostnych żuchwy królików wypełnionych kopolimerem P(LLA/GLA) wzmacnianym włóknami węglowymi. Rozprawa doktorska, Śląska Akademia Medyczna 2005.
- [4] Cieślak-Bielecka A., Adwent M., Proszek M., Bajor G., Sabat D., Cieślak T.: Ocena wstępna kopolimerów P(LLA/GLA) wprowadzonych w tkanki miękkie i żuchwę królików nowozelandzkich. Inż. Biomat., 2004, 38-42, 238-239.
- [5] Athanasiou K.A., Niederauer G.G., Agrawal C.M.: Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. Biomaterials, 1996, 17(2), 93-102.
- [6] Böstman O., Pihlajamäki H.: Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. Biomaterials, 2000, 21(24), 2615-2621.
- [7] Lajtai G., Balon R., Humer K., Aitzetmuller G., Unger F., Orthner E.: Resorbable interference screws. Histologic study 4.5 years postoperative. Unfallchirurg., 1998, 101(11), 866-875.
- [8] Lajtai G., Schmiedhuber G., Unger F., Aitzetmuller G., Klein M., Noszian I., Orthner E.: Bone tunnel remodeling at the site of biodegradable interference screws used for anterior cruciate ligament reconstruction: 5-year follow-up. Arthroscopy, 2001, 17(6), 597-602.
- [9] Pamuła E., Chłopek J., Błażewicz M., Makinen K., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Bero M.: Materiały kompozytowe z nowego biodegradowalnego kopolimeru glikolid-laktydu dla celów medycznych. Inż. Biomat., 2000, 12, 23-28.

and 21 day, however the most mineralization was between 6 and 12 week of observation.

The co-polymer P(LLA/GLA)+CF visibly caused acceleration of osseous tissue regeneration compared to control group.

107

References

- [10] Tiainen J., Soini Y., Tormala P., Waris T., Ashammakhi N.: Self-reinforced polylactide/ polyglycolide 80/20 screws take more than 1(1/2) years to resorb in rabbit cranial bone. J. Biomed. Mater. Res., 2004, 15;70B(1), 49-55.
- [11] Hickey T., Kreutzer D., Burgess D.J., Moussy F.: Dexamethasone/PLGA microspheres for continuous delivery of an anti-inflammatory drug for implantable medical devices. Biomaterials, 2002, 23(7), 1649-1656.
- [12] Holy C., Dang S., Davies J., Shoichet M.: In vitro degradation of novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam. Biomaterials, 1999, 20(13), 1177-1185.
- [13] Kim H.K., Park T.G.: Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release. J. Control Release, 2004, 23;98(1), 115-125.
- [14] Pamuła E., Błażewicz M., Buczyńska J., Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M.: Bioresorbowalne porowate podłoża dla inżynierii tkankowej z kopolimeru glikolidu z L-laktydem: wpływ mikrostruktury na osteoblasty in vitro. Inż. Biomat., 2003, 30-33, 95-99.
- [15] Chłopek J., Kmita G., Dobrzyński P., Bero M.: Właściwości zmęczeniowe śrub z kopolimeru P(LLA/GLA) oraz kopolimeru wzmacnianego włóknem węglowym. Inż. Biomat., 2002, 23-25, 88-90.
- [16] Proszek M., Adwent M., Cieślak-Bielecka A., Bajor G., Sabat D., Cieślak T., Morawska A.: Ocena gojenia ran kostnych żuchwy królików wypełnionych kopolimerem P(LLA/GLA) wzmacnianym włóknami węglowymi. Inż. Biomat., 2004, 38-42, 242-245.
- [17] Bero M., Dobrzyński P., Kasperczyk J., Grzeb P., Kryczka T., Ryba M., Walski M.: Kopolimery laktydu, glikolidu i e-kaprolaktonu niezawierające metali ciężkich. Synteza własności i zastosowanie w procesie kontrolowanego uwalniania analogów nukleozydów. Inż. Biomat., 2002, 23-25, 21-22.

IMMOBILIZACJA AMIKACYN NA RÓŻNYCH TYPACH PROTEZ NACZYNIOWYCH

MONIKA OSIŃSKA*, GRAŻYNA GINAŁSKA**, ADAM URYNIAK***

*ZAKŁAD BIOCHEMII, UNIwersytet M. CURIE-SKŁODOWSKIEJ, 20-031 LUBLIN, POLSKA

**KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII, AKADEMIA MEDYCZNA, LUBLIN, POLSKA

***SZPITAL MIEJSKI, ODDZ. CHIRURGII OGÓLNEJ I NACZYNIOWEJ, RZESZÓW, POLSKA

MONIOSI@POCZTA.ONET.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),107-109]

Biomateriałami stosowanymi w angioplastyce naczyń są: polietylenotereftalan, polimetylometakrylan, politetrafluoroetylen i poliuretan. Poliestrowe protezy naczyniowe często

IMMOBILIZATION OF AMIKACIN TO SEVERAL VASCULAR PROSTHESES FROM DIFFERENT SOURCES

MONIKA OSIŃSKA*, GRAŻYNA GINAŁSKA**, ADAM URYNIAK***

*DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, MARIA CURIE-SKŁODOWSKA UNIVERSITY, 20-031 LUBLIN POLAND

**CHAIR AND DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY, MEDICAL ACADEMY, LUBLIN, POLAND

***DIVISION OF GENERAL AND VASCULAR SURGERY, MUNICIPAL HOSPITAL, RZESZÓW, POLAND

MONIOSI@POCZTA.ONET.PL

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),107-109]

Poly (ethylene terephthalate), poly (methyl methacrylate),

••••• pokrywane są przez producentów białkami (kolagen, żelatyna, albumina) celem nadania im odpowiedniej szczelności oraz zmniejszenia ryzyka szybkiej elucji antybiotyku z ich powierzchni.

Poważnym problemem przy wykorzystaniu syntetycznych protez naczyniowych jest występowanie pooperacyjnych powikłań infekcyjnych często o charakterze śmiertelnym. Obecnie w celu zmniejszenia ryzyka zakażeń stosuje się nasączanie protez antybiotykami. Dotychczasowe badania oprócz wymienionej powyżej adsorpcji biernej obejmują także połączenia o charakterze jonowym. Ten sposób ochrony jest jednak mało skuteczny ze względu na brak stabilności tego typu wiązań powstałych pomiędzy lekiem a biomateriałem i w związku z tym krótkotrwałym efektem leczniczym antybiotyku (Kinney 1991, Gahtan 1995, Haverich, 1998).

Głównym celem naszej pracy było sprawdzenie możliwości kowalencyjnego (trwałego) wiązania amikacyny do różnych typów poliestrowych protez naczyniowych oraz nadanie im długotrwałych właściwości antybakteryjnych.

Unieruchomienie amikacyny z biomateriałem przeprowadzono w oparciu o metodę opisaną w zgłoszeniu patentowym Nr P958934 naszego autorstwa (Ginalska 2003). Do badań wybrano komercyjne protezy naczyniowe wykonane z poliestru powlekane w zależności od producenta żelatyną bądź kolagenem. Ilość amikacyny związanej do poszczególnych biomateriałów, wydajność procesu immobilizacji oraz poziom elucji antybiotyku do buforu określono metodą spektrofotometryczną z dialdehydem ftalowym (Fru-

polytetrafluoroethylene and polyurethane are biomaterials used in blood vessels angioplastic. Polyether vascular prostheses are often sealed with proteins (collagen, gelatin, albumin) in order to obtain the appropriate tightness and to reduce the risk of quick antibiotic elution from graft surfaces. Post-operative infections are serious often mortal complications appearing in application of synthetic vascular prostheses. At present, the prostheses soaking in antibiotic solution is often applied to decrease the infections rate. Recent research include the antibiotic attachment to prostheses via ionic interactions, apart from the physical adsorption mentioned above. These protection methods, however, lack the efficiency because of the short-lived therapeutic effect off prostheses - attached antibiotic, resulting from the lack of stability of the bonds (Kinney 1991, Gahtan 1995, Haverich, 1998).

Main aim of our work was to verify the possibility of durable covalent amikacin binding to different types of polyether vascular prostheses to obtain their long-lasting antibacterial properties.

Antibiotic immobilization on biomaterials was performed according to a method described in our Patent pending No 958934 (Ginalska 2003). Polyether vascular prostheses chosen for experiments were sealed with gelatin or collagen due to producer's preferences. Amount of amikacin bound to the biomaterials, immobilization yield and level of antibiotic elution to buffer was estimated by spectrophotometric method with phthaldialdehyde (Fruetos Cabanillas 2000) modified and optimized for our experiments. The results are presented in TABLE I. It was found that amikacin attaches to all tested vascular prostheses, however the immobilization yields and bound antibiotic amounts are the highest in case of gelatin-sealed biomaterials.

Next experiment showed that the antibiotic is bound via three types of interactions: physical (adsorption), ionic and covalent bonds. The percentage of particular interactions was estimated on base of the prostheses shaking in distilled water (removal of antibiotic attached by physical adsorption) and in solutions of NaCl in concentrations equal to ionic strengths previously determined for particular biomaterials (ionic interactions removal) TABLE II.

The experiment showed that the highest amount of antibiotic (77,3-89,6% of total amount) is covalently bound to prostheses. The durability of covalent bond between amikacin and different biomaterials types was tested by prostheses shaking in buffered saline solution (PBS) for 30 days. The prostheses soaked in antibiotic solution served as control. Low level of antibiotic elution from prostheses (2-3%) in comparison with control prostheses (50-100%) was observed, indicating the stability of created covalent bonds (FIG.1). In further research the bactericidal effect of immobilized amikacin against E. coli strain was tested. It was found that, on base of obtained results (TABLE III) that all types of amikacin-modified prostheses inhibited the growth of tested bacterial strain, in contrary to antibiotic-soaked control prostheses. Only in case of Gelsoft (modified by producer for ionic rifampicin attachment), the bactericidal effect was observed also for central prosthesis.

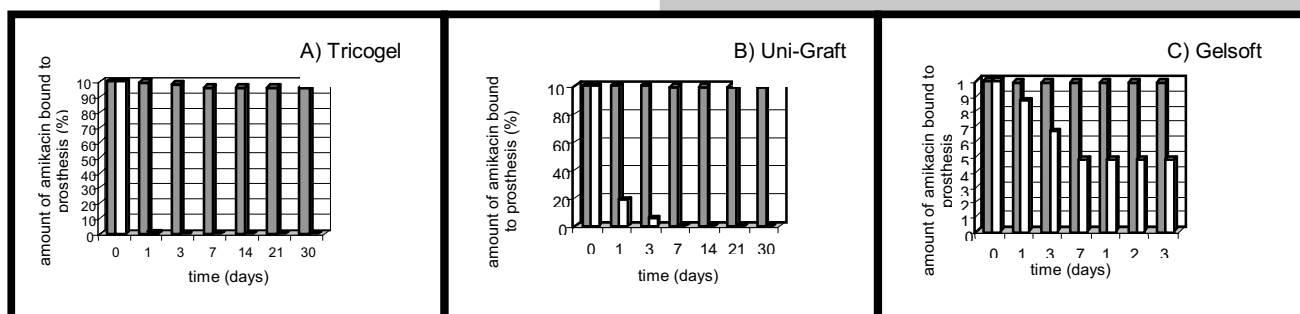
To sum up: the possibility of covalent immobilization of amikacin to different types of vascular prostheses was shown. The best immobilization results were obtained for gelatin-sealed biomaterials. All antibiotic-modified prostheses retain their bactericidal properties for least 30 days what may allow for sufficient protection against perioperative graft infections.

Rodzaj protezy Type of prosthesis		Hemashield Gold™ (Bost. Scient.)	Wovex™ (Bard)	Gelsoft™ (Vascutek)	Uni-Graft® DV straight (Braun)	Tricogel® (Tricomed)
Stężenie amikacyny Concentration of amikacin [mg/ml]	A	2,15	2,15	2,15	2,19	2,50
	B	1,84	1,76	1,51	1,41	1,92
Wydajność immobilizacji Immobilization yield [%]		14,4	18,1	30,0	35,6	23,2
Amikacyna związana z protezą Amikacin bound to prosthesis [mg/g]		2,48	3,12	5,12	6,24	4,64
A- concentration of amikacin before immobilization, B- concentration of amikacin after immobilization						

TABELA I. Rezultaty immobilizacji amikacyny na poliestrowych protezach naczyniowych.
TABLE I. Results of amikacin immobilization on vascular prostheses.

Rodzaj protezy Type of prosthesis	Hemashield Gold™ (Bost. Scient.)	Wovex™ (Bard)	Gelsoft™ (Vascutek)	Uni-Graft® DV straight (Braun)	Tricogel® (Tricomed)
Całkowita ilość związanej amikacyny Total amount of bound amikacin	100	100	100	100	100
Ilość amikacyny związanej adsorpcyjnie Amount of amikacin bound by physical adsorption	4,4	7,4	2,5	7,3	7,7
Ilość amikacyny związanej jonowo Amount of ionically bound amikacin	18,3	13,3	14,2	8,1	2,7
Ilość amikacyny związanej kowalencyjnie Ilość amikacyny związanej kowalencyjnie Amount of covalently bound amikacin	77,3	79,3	83,3	84,6	89,6

TABELA II. Procentowy udział różnych typów wiązań utworzonych pomiędzy amikacyną i protezą.
TABLE II. Percentage of different types of amikacin-prosthesis bonds.



tos Cabanillas 2000) zmodyfikowaną i zoptymalizowaną przez nas do potrzeb eksperymentu. Uzyskane wyniki przedstawia TABELA I. Stwierdzono, że amikacyna immobilizuje się na wszystkich typach testowanych protez naczyniowych, jednak w przypadku biomateriałów żelatynowanych poziom wydajności procesu i ilość związanego antybiotyku jest najwyższa. W kolejnym eksperymencie stwierdzono, że w immobilizacji leku biorą udział trzy typy oddziaływań: fizyczne (adsorpcja), jonowe i kowalencyjne. Udział poszczególnych typów wiązań utworzonych pomiędzy antybiotykiem a protezą sprawdzono poprzez wytrząsanie różnych typów protez w wodzie destylowanej (adsorpcja bierna) i roztworach NaCl o stężeniach zgodnych z wcześniej wyznaczonymi siłami jonowymi dla poszczególnych biomateriałów (wiązania jonowe) TABELA II.

Eksperymentalnie wykazano, iż największy procentowy udział w wiązaniu antybiotyku odgrywają wiązania kowalencyjne (77,3-89,6 %). Trwałość wiązań kowalencyjnych utworzonych pomiędzy różnymi typami biomateriałów a amikacyną badano poprzez wytrząsanie protez w buforowanym roztworze soli (PBS) w czasie 30 dni. Kontrolę stanowiły protezy nasączone antybiotykiem. Stwierdzono niski poziom elucji antybiotyku z protez eksperymentalnych (2-3%) w porównaniu do protez kontrolnych (50-100%) co świadczy o stabilności utworzonego wiązania kowalencyjnego (RYS.1). W dalszym etapie badań sprawdzano działanie bakteriobójcze unieruchomionej amikacyny wobec szczepu E.coli. Na podstawie uzyskanych wyników (TABELA III) stwierdzono zahamowanie wzrostu testowanego szczepu bakterii wobec wszystkich typów biomateriałów modyfikowanych amikacyną, w przeciwieństwie do protez nasączanych antybiotykiem. Tylko w przypadku protezy Gelsoft, która przez producenta przygotowywana jest do wiązania jonowego rifampicyny efekt bakteriobójczy uzyskano również dla protezy kontrolnej.

Reasumując: Wykazano możliwość wiązania kowalencyjnego amikacyny do różnych typów protez naczyniowych. Najlepsze efekty wiązania uzyskano dla biomateriałów powlekanych żelatyną. Wszystkie modyfikowane antybiotykiem protezy zachowują właściwości bakteriobójcze przez okres co najmniej 30 dni przez co mogą stanowić wystarczającą ochronę przed zakażeniami okołoperacyjnymi.

RYS. 1. Uwalnianie amikacyny z protez naczyniowych wytrząsanych przez 30 dni w PBS w temp. 37°C.

FIG. 1. Release of amikacin from vascular prostheses during 30 days of continuous shaking in PBS at 37°C.

Rodzaj protezy Type of prosthesis	Strefy zahamowania wzrostu Inhibition Zone Diameters (mm)
Hemashield	Kontrola / Control 0
Gold™ (Bost. Scient.)	Proteza modyfikowana / Modified prosthesis 26 ± 0,0
Wovex™ (Bard)	Kontrola / Control 0
	Proteza modyfikowana / Modified prosthesis 28 ± 0,0
Gelsoft™ (Vascutek)	Kontrola / Control 16 ± 0,1
	Proteza modyfikowana / Modified prosthesis 23 ± 0,2
Uni-Graft® DV straight (Braun)	Kontrola / Control 0
	Proteza modyfikowana / Modified prosthesis 23 ± 0,0
Tricogel® (Tricomed)	Kontrola / Control 0
	Proteza modyfikowana / Modified prosthesis 26 ± 0,2

Kontrola - protezy nasączone roztworem amikacyny
Control - prosthesis soaked with amikacin solution
Proteza modyfikowana - proteza po kowalencyjnej immobilizacji amikacyną
Modified-prosthesis - prosthesis modified by covalent amikacin immobilization

TABELA III. Strefy zahamowania wzrostu wyznaczone dla amikacyny zimmobilizowanej z protezami.

TABLE III. Inhibition zones E.coli growth as a function of biological activity of amikacin immobilized on prostheses.

Piśmiennictwo

- [1] Frutos Cabanillas P., Diez Pena E., Barrales-Rienda I.M. and Frutos, G.: Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release. *Int. J. Pharm.* (2000), 209, 15-26.
- [2] Gahtan, V., Esses, G.E., Bandy, D.F., Nelson, R.T., Dupont, E., Mills, J.L. Antistaphylococcal activity of rifampin-bonded gelatin impregnated Dacron grafts. *J. Surg. Res.*, 58, (1995), 105-110.
- [3] Ginalska G. Uryniak A., Łoborzewski J., Osińska M., A method of antibiotics immobilization. Polish Patent no P-358934, (2003).

References

- [4] Haverich, A., Hirt, S., Karak, M., Sialari, F., Wahling, H., Prevention of graft infection by bonding gentamicin to Dacron prostheses. *J. Vasc. Surg.* 15, (1998), 187-193.
- [5] Kinney, E.V., Bandyk, D.F., Seabrook, G.A., Antibiotic bonded PTFE vascular grafts: the effect of silver antibiotic on bioactivity following implantation. *J. Surg. Res.*, 50, (1991), 430-435.

110. RADIACYJNA STERYLIZACJA POLI(ϵ -KAPROLAKTONU) (I)

KATARZYNA FILIPCZAK*, MAGDALENA WOŹNIAK*, LASZLO OLAH**, PIOTR ULAŃSKI*, JANUSZ M. ROSIAK*, RADOŚLAW M. OŁKOWSKI***, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ***

*MIĘDZYRESORTOWY INSTYTUT TECHNIKI RADIACYJNEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA, UL. WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ

**DEPARTMENT OF POLYMER ENGINEERING, BUDAPEST UNIVERSITY OF TECHNOLOGY AND ECONOMICS, MUEGYETEM RKP. 3, H-1111 BUDAPEST, HUNGARY

***ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA, AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE, UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),110-112]

Wstęp

Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) jest badany pod kątem przydatności do wytwarzania biodegradowalnych, porowatych struktur do zastosowania w inżynierii tkankowej, np. do odbudowy tkanki kostnej [1,2]. Z uwagi na niską odporność termiczną (temperatura topnienia 55-60°C), a także konieczność sterylizacji przestrzennych, porowatych kształtek, optymalną metodą sterylizacji PCL wydaje się zastosowanie promieniowania jonizującego. Aby skutecznie, racjonalnie modyfikować i sterylizować biomateriały zawierające PCL za pomocą techniki radiacyjnej, niezbędne jest poznanie mechanizmu przemian, jakim ulega ten polimer pod wpływem promieniowania. Celem tej pracy było stwierdzenie, czy dominującym skutkiem napromieniania PCL jest degradacja, czy sieciowanie prowadzące do wzrostu średniego ciężaru cząsteczkowego, zbadanie wpływu napromieniania na wytrzymałość mechaniczną polimeru oraz przeprowadzenie wstępnych testów biogodności napromienionego PCL.

Materiał i metody

Poli(ϵ -kaprolakton) (Aldrich, nominalny $M_w=80$ kDa), oczyszczano poprzez wytrącenie wodą z roztworu w acetonie. Próbkę poddawano działaniu promieniowania jonizującego w temperaturze pokojowej, z dostępem powietrza lub szczelnie zamknięte po uprzednim usunięciu powietrza poprzez przedmuchiwanie stopionego PCL argonem. Wagowo średnie ciężary cząsteczkowe oznaczano metodą statycznego rozpraszania światła laserowego (Brookhaven Instruments, BI-200SM). Frakcję żelową mierzono grawimetrycznie po uprzednim usunięciu frakcji zolowej poprzez ekstrakcję tetrahydrofuranem. Pomiary wytrzymałościowe wykonano za pomocą urządzenia Instron 5566. We wstępnych badaniach biologicznych próbki polimeru podano sterylizacji dwiema metodami: radiacyjną (poprzez napromienienie dawką 25 kGy) oraz poprzez zanurzenie na 2 h w 10% roztworze antybiotyku-antymikotyku (Gibco, 1000 u/ml penicillin G sodium, 1000 µg/ml streptomycin sulphate, 2,5 µg/ml amphotericin B). Następnie badano żywotność ludzkich osteoblastów w kontakcie z PCL sterylizowanym obiema metodami. Komórki hodowano przez 7 dni, a ich przeżywalność badano za pomocą testu XTT [3].

Wyniki

Zmiany wagowo średnich ciężarów cząsteczkowych PCL w funkcji zaabsorbowanej dawki promieniowania jonizującego

RADIATION STERILIZATION OF POLY(ϵ -CAPROLACTONE) (I)

KATARZYNA FILIPCZAK*, MAGDALENA WOŹNIAK*, LASZLO OLAH**, PIOTR ULAŃSKI*, JANUSZ M. ROSIAK*, RADOŚLAW M. OŁKOWSKI***, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ***

*INSTITUTE OF APPLIED RADIATION CHEMISTRY, TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ, WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ, POLAND

**DEPARTMENT OF POLYMER ENGINEERING, BUDAPEST UNIVERSITY OF TECHNOLOGY AND ECONOMICS, MUEGYETEM RKP. 3, H-1111 BUDAPEST, HUNGARY

*** DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSAW, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),110-112]

Introduction

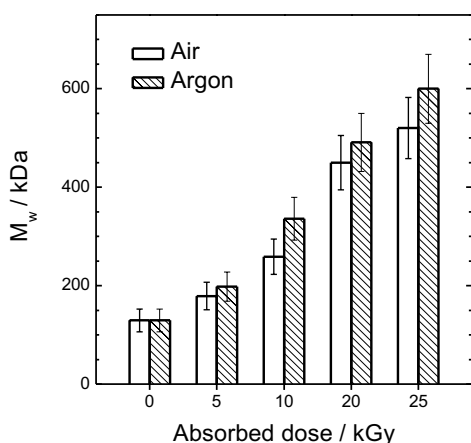
Poly(ϵ -caprolactone) is being tested as a substrate for manufacturing biodegradable, porous structures (scaffolds) to be used in tissue engineering, e.g. for bone tissue regeneration [1,2]. Due to the low thermal resistance of PCL (melting temperature of 55-60°C) and because of the necessity of sterilizing three-dimensional, porous structures, application of ionizing radiation seems to be method of choice for sterilization of such scaffolds. Efficient and rational application of radiation technique in sterilization and modification of PCL-based biomaterials requires the mechanism of radiation-induced transformations in this polymer to be known in some detail. The aim of our work was to find out whether irradiation of PCL leads mainly to degradation or to cross-linking resulting in an increase in average molecular weight and to follow the influence of irradiation on the mechanical strength of the polymer. We also planned preliminary tests to assess the influence of irradiation on PCL biocompatibility.

Materials and methods

Poly(ϵ -caprolactone) (Aldrich, nominal $M_w = 80$ kDa), was purified by precipitation with water from acetone solution. Samples were subjected to ionizing radiation in the solid state at R.T., with free access of air or in gas-tight vessels after purging with argon in the molten state and subsequent cooling. Weight-average molecular weights were measured by static laser light scattering (Brookhaven Instruments, BI-200SM). Gel fractions were determined gravimetrically after removing the sol fraction by extraction with tetrahydrofurane. Mechanical properties were measured with an Instron 5566 machine. In preliminary biological tests, PCL samples were sterilized by two methods: irradiation with a dose of 25 kGy or immersion for 2 h in 10% solution of an antibiotic-antimycotic (Gibco, 1000 u/ml penicillin G sodium, 1000 µg/ml streptomycin sulphate, 2,5 µg/ml amphotericin B). Subsequently, vitality of human osteoblasts in contact with PCL samples sterilized by each method has been assessed. The cells were cultured for 7 days and the vitality was determined by XTT test [3].

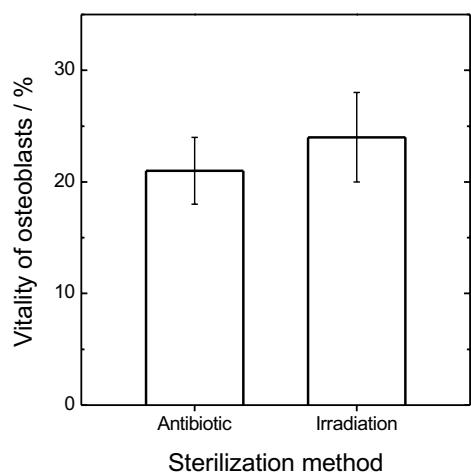
Results

Changes in weight-average molecular weight of PCL as a function of absorbed dose are shown in FIG.1, while FIG.2



RYS. 1. Zmiany wagowo średniego ciężaru cząsteczkowego PCL w funkcji dawki zaabsorbowanego promieniowania jonizującego, dla próbek napromienianych w obecności i w nieobecności powietrza.

FIG. 1. Changes in weight-average molecular weight of PCL as a function of absorbed dose of ionizing radiation, for samples irradiated in the presence and absence of air.



RYS. 3. Żywotność osteoblastów w kontakcie z PCL sterylizowanym dwiema metodami, oceniana za pomocą testu XTT względem wzorcowej powierzchni polistyrenowej (TCPS).

FIG. 3. Vitality of osteoblasts in contact with PCL sterilized by two methods, determined by XTT test in relation to a standard polystyrene surface (TCPS).

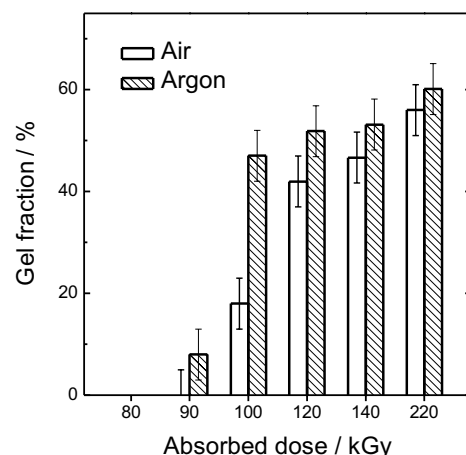
cego są pokazane na RYS.1, natomiast RYS.2 przedstawia powstawanie frakcji usieciowanej (żelowej) przy wysokich dawkach promieniowania.

W TABELI 1 przedstawiono zmiany wytrzymałości PCL na ściskanie wywołane napromienianiem.

RYS.3 ilustruje przeżywalność osteoblastów w kontakcie z PCL sterylizowanym dwiema metodami: radiacyjną i z użyciem antybiotyku.

Dyskusja

Pomiary zmian wagowo średnich ciężarów cząsteczkowych PCL wskazują, że wartości tego parametru rosną wraz z zaabsorbowaną dawką promieniowania, a zatem dominującym procesem towarzyszącym napromienianiu PCL jest



RYS. 2. Udział frakcji żelowej PCL w zależności od zaabsorbowanej dawki promieniowania jonizującego, dla próbek napromienianych w obecności i w nieobecności powietrza.

FIG. 2. Gel fraction of PCL as a function of absorbed dose of ionizing radiation, for samples irradiated in the presence and absence of air.

DAWKA ABSORBED DOSE	MODUŁ ELASTYCZNOŚCI (test na ściskanie) COMPRESSIVE ELASTIC MODULUS MPa
kGy	
0	156
20	170
280	191

TABELA 1. Wartości modułu Younga dla nienapromienionych i napromienionych litych próbek PCL (napromienianie w obecności powietrza).

TABLE 1. Values of Young's modulus in compression tests on non-irradiated and irradiated solid PCL samples (irradiation was performed in the presence of air).

illustrates the formation of gel (cross-linked) fraction at high doses.

Changes in compression strength of PCL caused by irradiation are shown in TABLE 1.

FIG.3 illustrates the vitality of osteoblasts in contact with PCL sterilized by two methods: irradiation and treatment with an antibiotic.

Discussion

The values of weight-average molecular weight of PCL increase with absorbed dose. This indicates that cross-linking is the dominating process induced by irradiation. Efficiency of this process is somewhat higher when the polymer is irradiated in the absence of air, since the presence of oxygen promotes competing degradation reactions. Irradiation of PCL with high doses leads to the formation of insoluble, cross-linked (gel) fraction. Gel formation is more efficient for irradiation in the absence of air. This is expressed by a lower gelation dose (88 kGy compared to 94 kGy for samples irradiated in the presence of oxygen) and higher gel fractions at equal absorbed doses. Even at the highest

sieciowanie. Efektywność tego procesu jest nieco wyższa, jeśli polimer jest napromieniany bez dostępu powietrza, ponieważ obecność tlenu sprzyja występowaniu konkurencyjnych względem sieciowania reakcji degradacji.

Napromienienie PCL wysokimi dawkami prowadzi do wytworzenia frakcji usieciowanej (żelowej). Tworzenie żelu jest nieco bardziej efektywne przy napromienianiu bez dostępu powietrza, co przejawia się niższą wartością dawki żelowania (88 kGy wobec 94 kGy dla próbek napromienianych w obecności tlenu) oraz wyższą zawartością frakcji żelowej przy pochłonięciu jednakowych dawek. Nawet przy najwyższych zastosowanych dawkach udział frakcji żelowej nie przekracza 60%, a zatem w układzie pozostaje znaczna liczba łańcuchów nie związanych w sieć. Można to interpretować jako wynik jednoczesnego zachodzenia reakcji sieciowania i degradacji w badanym układzie oraz znacznego udziału w stałym PCL frakcji krystalicznej, w obrębie której sieciowanie jest mniej efektywne niż we frakcji amorficznej.

Ważnym praktycznym skutkiem przewagi procesów sieciowania nad degradacją podczas napromieniania PCL jest fakt, że nie następuje pogorszenie właściwości mechanicznych materiału, często obserwowane dla wielu innych polimerów i ograniczające możliwość ich radiacyjnej sterylizacji. Zgodnie z oczekiwaniem, wskutek sieciowania obserwuje się nawet pewien wzrost wytrzymałości w funkcji zaabsorbowanej dawki promieniowania. Należy zaznaczyć, że opisane tu pomiary wytrzymałościowe wykonano bezpośrednio po napromienieniu próbek. Wskutek efektu następczego, którego istnienie sygnalizujemy w kolejnym artykule, właściwości napromienionych próbek mogą ulegać pewnym zmianom w czasie ich przechowywania.

Wstępne badania mające na celu ocenę wpływu sterylizacji radiacyjnej na biogodność PCL wykazały, że przeżywalność osteoblastów w kontakcie z PCL sterylizowanym obiema metodami, radiacyjną i z użyciem antybiotyku, jest porównywalna. Jeśli założyć, że kontakt PCL z roztworem antybiotyku nie wpływa w znaczący sposób na chemiczną i fizyczną budowę polimeru, czyli że próbka sterylizowana tą metodą może być utożsamiana z wyjściowym PCL, wyniki przeprowadzonego wstępnego testu wskazują, że sterylizacja radiacyjna nie prowadzi do istotnego pogorszenia biogodności.

Wnioski

Dominującym skutkiem napromieniania poli(ϵ -kapolaktonu) jest sieciowanie międzycząsteczkowe prowadzące do wzrostu średniego ciężaru cząsteczkowego, a przy odpowiednio dużych dawkach do utworzenia przestrzennej sieci łańcuchów połączonych ze sobą wiązaniami kowalencyjnymi (żel). W wyniku tych procesów, napromienianie powoduje wzrost wytrzymałości mechanicznej PCL. Sterylizacja radiacyjna nie prowadzi do istotnego pogorszenia biogodności PCL.

Podziękowania

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji w ramach projektu 05/PBZ-KBN-082/T08/2002. L.O. dziękuje Komisji Europejskiej za stypendium w ramach projektu Marie Curie Training Site "Polymeric Biomaterials" (HPMT-CT-2001-00228).

doses applied, the gel fraction does not exceed 60%, thus there is a considerable fraction of unbound, single polymer chains left in the system. This can be explained as a result of cross-linking and degradation reactions taking place side-by-side. A factor that may also contribute is a high fraction of crystalline phase in solid PCL, where the cross-linking is expected to be much less efficient than in the amorphous phase.

An important result of the dominance of cross-linking over chain scission during irradiation of PCL is the lack of deterioration in mechanical properties. The latter effect is frequently encountered for other polymers, being a serious obstacle to their radiation sterilization. As expected, in the case of PCL there is even some increase in mechanical strength with increasing dose. One should mention that the mechanical tests described here were performed directly after irradiation. As a result of post-effect, described in more detail in the following paper, the properties of irradiated PCL samples may undergo some changes during long-term storage.

Initial tests aimed at assessment of the irradiation influence on biocompatibility of PCL indicate that vitality of osteoblasts in contact with PCL sterilized by both methods, irradiation and antibiotics, is comparable. If we assume that the contact with antibiotics in solution has no marked influence on the chemical and physical structure of the polymer (i.e. that the sample sterilized with antibiotics is equivalent to non-irradiated PCL), the obtained results show no significant decrease in biocompatibility due to radiation sterilization.

Conclusions

The main effect of irradiation on poly(ϵ -caprolactone) is intermolecular cross-linking leading to an increase in average molecular weight and, at sufficiently high doses, to the formation of three-dimensional network of covalently bound chains (gel). As a result, an increase in mechanical strength of PCL is observed.

Radiation sterilization does not lead to significant decrease in biocompatibility of PCL.

Acknowledgements

This work was financed by the Minister of Science and Information Society Technologies, Poland (project 05/PBZ-KBN-082/T08/2002). L.O. thanks the European Commission for a stipend in the framework of Marie Curie Training Site "Polymeric Biomaterials" (HPMT-CT-2001-00228).

Piśmiennictwo

References

- [1] Corden T.J.; Jones I.A., Rudd C.D., Christian P., Downes S., McDougall K.E.: Physical and Biocompatibility Properties of Poly- ϵ -Caprolactone Produced Using In Situ Polymerisation: A Novel Manufacturing Technique for Long-Fibre Composite Materials, *Biomaterials* 21, (2000), 713-724.
- [2] Kweon H., Yoo M.K., Park I.K., Kim T.H., Lee H.Ch., Lee H.-S., Oh J.-S., Akaike T., Cho Ch.-S.: A Novel Degradable Polycaprolactone Networks for Tissue Engineering, *Biomaterials* 24, (2003), 801-808.
- [3] Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Paull K.D., Tierney S.: Evaluation of a Soluble Tetrazolium / Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines, *Cancer Res.* 48, (1988), 4827-4833.

RADIACYJNA STERYLIZACJA POLI(ϵ -KAPROLAKTONU) (II)

KATARZYNA FILIPCZAK*, MAGDALENA WOŹNIAK*,
PIOTR ULAŃSKI*, JANUSZ M. ROSIAK*, GRAŻYNA PRZYBYTNIK**,
RADOSŁAW M. OLKOWSKI***, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-
SZUMIEŁ***

*MIĘDZYRESORTOWY INSTYTUT TECHNIKI RADIACYJNEJ,
POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
UL. WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ

**INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ,
UL. DORODNA 16, 03-195 WARSZAWA

***ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,
AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE,
UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),113-115]

Wstęp

W procesie wytwarzania porowatych struktur z poli(ϵ -kaprolaktonu) - PCL - przeznaczonych do zastosowań biomedycznych, rozważa się wykorzystanie sterylizacji radiacyjnej. Napromienianie PCL powoduje opisane w poprzednim artykule zmiany struktury cząsteczkowej polimeru wskutek reakcji wolnych rodników generowanych pod wpływem promieniowania. Jeśli napromienimy w celu sterylizacji materiał zawierający stały PCL, można oczekiwać, że nie wszystkie wygenerowane rodniki zanikną bezpośrednio po napromienieniu. Część z nich może być pułapkowana w obszarach krystalicznych polimeru i zanikać (reagować) bardzo powoli, w czasie wielu godzin, a nawet wielu dni po napromienieniu. Wskutek tego zjawiska struktura cząsteczkowa i pewne właściwości napromienionego produktu mogą ulegać zmianom w podobnej skali czasowej (tzw. efekt następny), a zatem właściwości materiału przechowywanego przez dłuższy czas po sterylizacji mogą się różnić od właściwości wykazywanych bezpośrednio po napromienieniu. Efekty następne towarzyszące napromienieniu PCL nie były dotychczas opisane, mimo że analogiczne zjawiska są znane dla innych polimerów, na przykład dla polipropylenu [1,2].

Celem pracy było wykazanie istnienia efektu następnego w PCL po napromienieniu w temperaturze pokojowej, potwierdzenie, że efekt ten jest związany z istnieniem pułapkowanych (długo żyjących) rodników i przeprowadzenie wstępnych testów biologicznych mających wykazać, czy efekt następny powoduje wyraźne zmiany biogodności materiału.

Materiał i metody

Poli(ϵ -kaprolakton) (Aldrich, nominalny $M_w=80$ kDa), oczyszczano poprzez wytrącenie wodą z roztworu w acetonie. Próbkę poddawano działaniu promieniowania jonizującego z dostępem powietrza. Lepkości istotne roztworów PCL w tetrahydrofuranie oznaczano w 25,0 oC za pomocą wiskozymetru Ubbelohde'a (AVS-310, Schott Geräte). Badano żywotność ludzkich osteoblastów w kontakcie z PCL o różnym okresie przechowywania (w temperaturze pokojowej z dostępem powietrza) po napromienieniu. Komórki hodowano przez 7 dni, a ich przeżywalność badano za pomocą testu XTT. Dane dotyczące szybkości zaniku przejściowych produktów radiolizy PCL w stanie stopionym otrzymano metodą radiolizy impulsowej z detekcją spektrofotometryczną [3].

RADIATION STERILIZATION OF POLY(ϵ -CAPROLACTONE) (II)

113
.....

KATARZYNA FILIPCZAK*, MAGDALENA WOŹNIAK*,
PIOTR ULAŃSKI*, JANUSZ M. ROSIAK*, GRAŻYNA PRZYBYTNIK**,
RADOSŁAW M. OLKOWSKI***, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-
SZUMIEŁ***

*INSTITUTE OF APPLIED RADIATION CHEMISTRY,
TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,
WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ, POLAND

**INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY,
DORODNA 16, 03-195 WARSZAW, POLAND

*** DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY,
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSZAW,
CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAW, POLAND

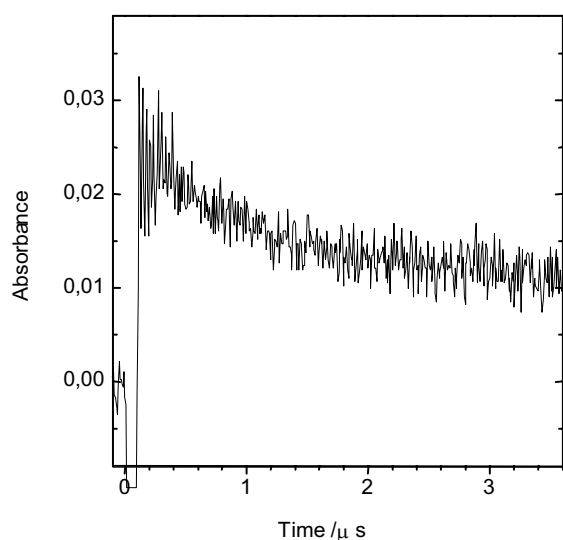
[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),113-115]

Introduction

In the manufacturing process of porous polymeric structures for biomedical applications based on poly(ϵ -caprolactone) - PCL, the use of ionizing radiation is considered for sterilization. As described in the preceding paper, irradiation of PCL causes changes in molecular structure of this polymer due to the reactions of radiation-generated free radicals. It is expected that in solid PCL not all radicals decay immediately after the irradiation is terminated. Some part of radicals may be trapped in crystalline regions of the polymer and decay (react) very slowly, in hours or even days after irradiation. Because of that, molecular structure and some properties of the product may undergo changes at a similar time scale ("post-effect"). Therefore, the properties of PCL stored for a long time after irradiation may be different from the properties observed just after radiation processing. Radiation-induced post-effect in PCL has not yet been described, despite the fact that such phenomena are known in other polymers, e.g. polypropylene [1,2]. The aim of this work was to prove the existence of radiation-induced post-effect in solid PCL, to confirm that this effect is caused, at least in part, by the existence of trapped (long-lived) polymer radicals and to conduct preliminary biological tests on the influence of post-effect on the biocompatibility of irradiated PCL.

Materials and methods

Poly(ϵ -caprolactone) (Aldrich, nominal $M_w=80$ kDa), was purified by precipitation with water from acetone solution. Samples were subjected to ionizing radiation at R.T. in the presence of air, unless stated otherwise. Intrinsic viscosities of PCL in tetrahydrofurane were determined at 25.0 oC with an Ubbelohde viscometer (AVS-310, Schott Geräte). Vitality of human osteoblasts was tested in contact with PCL stored (at R.T. in the presence of air) for various periods of time after irradiation. The cells were cultured for 7 days and the vitality was determined by XTT test. Data on the decay of transient products formed by the radiolysis of molten PCL were obtained by pulse radiolysis with spectrophotometric detection [3].



RYS. 1. Kinetyka zaniku przejściowych produktów radiolizy PCL po impulsowym napromienieniu dawką 50 Gy odtlenionego, stopionego polimeru w temperaturze 60°C. Absorbancja przy $\lambda=295$ nm w funkcji czasu.

FIG. 1. Decay kinetics of transient reactive species after pulse-irradiation of deoxygenated, molten PCL at 60°C with a dose of 50 Gy. Absorbance at $\lambda=295$ nm as a function of time after pulse.

Wyniki

Jeśli PCL jest napromieniony w stanie stopionym, reakcje produktów przejściowych radiolizy są szybkie (czas połowkowy ich zaniku jest rzędu kilku mikrosekund, RYS.1), i po krótkim czasie układ osiąga stabilny stan końcowy.

Jeśli jednak PCL jest napromieniony w stanie stałym, zanik wolnych rodników jest bardzo powolny i obserwuje się zmiany właściwości materiału przechowywanego przez dłuższy czas po sterylizacji.

RYS.2 ilustruje zmiany lepkości istotnej roztworów PCL w tetrahydrofuranie, w funkcji czasu przechowywania próbek po napromienieniu. Próbkę były napromieniane i przechowywane z dostępem powietrza w stanie stałym w temperaturze pokojowej, a roztwory do pomiarów wiskozymetrycznych były wykonywane bezpośrednio przez wykonaniem analizy. Lepkość istotna jest funkcją średniego ciężaru cząsteczkowego.

Na RYS.3 przedstawiono wyniki badań żywotności osteoblastów w kontakcie z PCL, dla próbek przechowywanych przez różny czas po napromienieniu.

Dyskusja

Ciężar cząsteczkowy PCL po napromienieniu ulega istotnym zmianom w ciągu 14 dni od napromienienia - początkowo obserwuje się wzrost, a następnie spadek wartości tego parametru, co może wskazywać na początkową dominację reakcji sieciowania, a następnie degradacji (należy zaznaczyć, że przy przechowywaniu stałego, nie napromienionego PCL przez 14 dni nie obserwuje się zmian lepkości roztworów). Wstępne pomiary wykonane metodą EPR wykazały, że istotnie po napromienieniu w temperaturze pokojowej w PCL obserwuje się wolne rodniki. Po 2 godzinach od napromienienia dawką 28 kGy ich stężenie zmniejsza się o około 20%. Otrzymane wyniki wskazują, że można istotnie wiązać występowanie efektu następczego w PCL

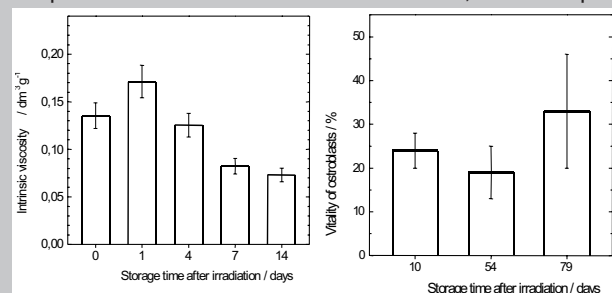
Results

If PCL is irradiated in the molten state, reactions of the transient radiolysis products are very fast (their half-life is in the order of a few microseconds, FIG.1) and after a short time the system attains the final, stable state.

If, however, the same polymer is irradiated in the solid state, the decay of some of the radicals is very slow, and properties of PCL change in the course of time after sterilization. FIG.2 illustrates the changes in intrinsic viscosity of PCL solutions in tetrahydrofurane, as a function of sample storage time after irradiation. The samples were irradiated and stored in the solid state at R.T. in the presence of air, and the solutions were prepared directly before analysis. Intrinsic viscosity is a function of the average molecular weight. Results of osteoblast vitality tests in contact with PCL stored for various period of time after irradiation are presented in FIG.3.

Discussion

The average molecular weight of PCL undergoes significant changes within 14 days after irradiation. Initially an increase and subsequently a decrease in molecular weight is observed. This is probably due to the initial domination of cross-linking reactions and, at a longer time-scale, to the prevalence of chain scission processes (it should be noted that in solid, non-irradiated PCL no significant change in solution viscosity is observed within 14 days of storage). Preliminary EPR measurements indicate that in fact radicals can be observed in solid PCL after irradiation at R.T. Their concentration is reduced by ca. 20% in 2 hours after irradiation by a dose of 28 kGy. These results indicate that the post-effect observed in irradiated PCL is, at least in part,



RYS. 2. Zależność lepkości istotnej roztworów PCL w tetrahydrofuranie w temperaturze 25,0°C od czasu przechowywania próbek polimeru po napromienieniu. Próbkę napromieniano i przechowywano w stanie stałym w temperaturze pokojowej, z dostępem powietrza. Dawka 15 kGy.

FIG. 2. Intrinsic viscosity of PCL in tetrahydrofurane at 25.0°C as a function of sample storage time after irradiation (dose 15 kGy). Samples were irradiated and stored in the solid state, at R.T., in the presence of air.

RYS. 3. Żywotność osteoblastów w kontakcie z PCL o różnym czasie przechowywania po napromienieniu, oceniana za pomocą testu XTT w z g l ę d e m w z o r c o w e j powierzchni polistyrenowej (TCPS).

FIG. 3. Vitality of osteoblasts in contact with PCL stored for various period of time after irradiation, determined by XTT test in relation to a standard polystyrene surface (TCPS).

z istnieniem stosunkowo stabilnych wolnych rodników. Na obecnym etapie badań nie można jednak wykluczyć również innych, dodatkowych mechanizmów powodujących degradację polimeru w długiej skali czasowej, na przykład poprzez rozkład ugrupowań nadtlennokowych.

Z praktycznego punktu widzenia jest bardzo istotne, czy towarzyszący sterylizacji radiacyjnej materiałów wykonanych z PCL efekt następczy wpływa w zasadniczy sposób na ich biogodność. Przeprowadziliśmy wstępne testy żywotności ludzkich osteoblastów wyizolowanych z fragmentów kości, hodowanych w kontakcie ze sterylizowanym radiacyjnie PCL, przy czym okres od sterylizacji do rozpoczęcia hodowli (trwającej zawsze 7 dni) był różny i zawierał się w przedziale od 10 do 79 dni. Otrzymane wyniki nie wykazały statystycznie istotnych różnic żywotności komórek pozostających w kontakcie z PCL o różnym czasie przechowywania po napromienieniu, a zatem nie wykazały istotnego pogorszenia się biogodności PCL wskutek efektu następczego. Jest oczywiste, że efekt następczy ma bardzo istotne znaczenie dla praktycznej możliwości stosowania sterylizacji radiacyjnej produktów z PCL i badania nad tym zjawiskiem muszą być kontynuowane.

Wnioski

Napromienianiu poli(ϵ -kapolaktonu) w stanie stałym towarzyszy wyraźny efekt następczy, przejawiający się w postępujących, przez co najmniej 14 dni po napromienieniu, zmianach ciężarów cząsteczkowych polimeru. Efekt ten jest przynajmniej częściowo spowodowany pułapkowaniem generowanych radiacyjnie rodników polimerowych w obszarach krystalicznych PCL. Wstępne badania nie wykazały istotnego pogorszenia się biogodności PCL wskutek efektu następczego. Jednak w perspektywie stosowania sterylizacji radiacyjnej do biomateriałów zawierających PCL wydaje się celowe prowadzenie dalszych badań nad tym zjawiskiem.

Podziękowania

Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji w ramach projektu 05/PBZ-KBN-082/T08/2002.

Piśmiennictwo

[1] Gavrilu D.E., Gosse B.J.: Post-irradiation Degradation of Polypropylene, *Radioanal. Nucl. Chem.*, 185, (1994), 311-317.

related to the existence of trapped, relatively stable radicals. At the current stage of studies it is not possible, however, to exclude the presence of other mechanisms causing slow degradation of PCL after irradiation, e.g. decomposition of hydroperoxides.

From the practical point of view, it is very important to know whether the post-effect accompanying radiation sterilization of PCL-based biomaterials has a pronounced influence on their biocompatibility. We have performed preliminary tests on human osteoblasts isolated from bone fragments, cultivated in contact with radiation-sterilized PCL, while the period between sterilization and start of the culture was varied from 10 to 79 days. The obtained results do not indicate any statistically significant difference in vitality of osteoblasts in contact with PCL of various post-irradiation storage period, thus there is no indication of any detrimental influence of post-effect on the PCL biocompatibility. It is clear that the radiation-induced post-effect is of great importance for the practical possibility of applying radiation sterilization to PCL-based biomaterials and that the studies on this phenomenon should be continued.

Conclusions

Irradiation of solid poly(ϵ -caprolactone) is accompanied by a pronounced post-effect that manifests itself by changes in average molecular weight in the period of at least 14 days after radiation treatment. This effect is, at least in part, caused by trapping of radiation-generated polymer radicals in crystalline regions of PCL. Preliminary data do not indicate any negative influence of the post-effect on the biocompatibility of PCL, but there is a need for more detailed studies on this phenomenon before radiation sterilization is applied to PCL-based biomaterials.

Acknowledgements

This work was financed by the Minister of Science and Information Society Technologies, Poland (project 05/PBZ-KBN-082/T08/2002).

References

[2] Faucitano A., Buttafava A., Martinotti F., Bortolus P., Comincioli V.: ESR Study of the Molecular Dynamic of Peroxyradicals in the Post-irradiation Oxidation of Isotactic Polypropylene, *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.* 25, (1987), 1517-1521.
[3] von Sonntag C., Schuchmann H.-P.: Pulse Radiolysis, *Meth. Enzymol.* 233, (1994), 3-20.

BADANIA LUDZKICH KAMIENI ŻÓŁCIOWYCH PRZY UŻYCIU MIKROSKOPU SIŁ ATOMOWYCH - OSIĄGNIĘCIA I TRUDNOŚCI

IWONA MRÓZ, BOGDAN BARWIŃSKI, KLAUDIA MATYKA,
ANTONI CISZEWSKI

INSTYTUT FIZYKI DOŚWIADCZALNEJ, UNIwersYTET WROCLAWSKI
PLAC MAXA BORNA 9, 50-204 WROCLAW
IMROZ@IFD.UNI.WROC.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),116-117]

Proces tworzenia się kamieni żółciowych w organizmie ludzkim nie został do końca poznany. Wydaje się, że informacji dotyczących powstawania kamieni może dostarczyć analiza ich budowy. Na powierzchni i na przekrojach niektórych kamieni można bowiem zaobserwować charakterystyczne struktury warstwowe w postaci pierścieni koncentrycznych o różnych barwach i składzie chemicznym [1,2]. Powstawanie takich pierścieni próbuje się wyjaśniać w oparciu o teorię Lieseganga [3], opisującą krystalizowanie się periodycznych struktur w warunkach dalekich od równowagi. Głównymi składnikami chemicznymi kamieni żółciowych są: cholesterol, substancje białkowe barwniki żółciowe (bilirubina) i ich pochodne oraz węglany wapnia. Spotyka się też domieszki nieorganiczne i materiał pochodzenia biologicznego (np. bakterie). Od zawartości głównych składników zależy barwa kamienia oraz obecność i układ pierścieni. Według jednej z klasyfikacji, stosowanej do celów praktycznych, wyróżnia się kamienie białe, brązowe i czarne [4]. Kamienie żółciowe po wyjęciu z pęcherzyka żółciowego pacjenta posiadają wilgotne jądro o niejednorodnej strukturze, otoczone warstwą zewnętrzną (skorupą) twardniejącą w miarę oddalania się od jądra. W obrębie skorupy mogą występować pierścienie. Z czasem jądro wysycha i w części centralnej kamienia może utworzyć się pusta przestrzeń. Dokładne zbadanie rozmieszczenia przestrzennego składników kamienia w obrębie całego kamienia oraz w obrębie poszczególnych pierścieni (określenie mikrostruktury pierścieni) może przyczynić się do wyjaśnienia sposobu formowania się kamieni. Badania takie powinny objąć, oprócz analizy chemicznej, analizę rozkładu przestrzennego elementów strukturalnych (m.in. obecności i wielkości mikrokryształów, które mogą być tworzone przez różne substancje chemiczne).

Celem naszych badań było określenie różnic w mikrostrukturze kamieni różnych typów pod kątem analizy elementów strukturalnych oraz wykazanie zróżnicowania przestrzennego w obrębie tego samego kamienia (pomiędzy jądrem, skorupą oraz pierścieniami skorupy). Wykorzystując mikroskopy sił atomowych Nanoscope E i Nanoscope IIIa, Veeco, analizowaliśmy rozmiary elementów strukturalnych oraz badaliśmy związek pomiędzy wielkością tych elementów a ich rozmieszczeniem w obrębie kamieni. Pomiarów wykonywaliśmy głównie w trybie kontaktowym. Badaliśmy również możliwości obrazowania kamieni przy użyciu trybu quasi-niekontaktowego (tapping mode) i wykorzystania trybu obrazowania fazowego.

Obrazowanie prowadziliśmy dla kamieni świeżych i suchych białych, brązowych i czarnych. Kamienie były poddane procedurze łupania w celu odsłonięcia przekroju. Badano powierzchnie przekrojów niezmodyfikowane oraz poddane obróbce mechanicznej (wygładzanie) i chemicznej. Powierzchnie przekroju obrazowano systematycznie od jądra

LAFM INVESTIGATIONS OF HUMAN GALLSTONES - ACHIEVEMENTS AND DIFFICULTIES

IWONA MRÓZ, BOGDAN BARWIŃSKI, KLAUDIA MATYKA,
ANTONI CISZEWSKI

INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PHYSICS, UNIVERSITY OF WROCLAW
PLAC MAXA BORNA 9, 50-204 WROCLAW, POLAND
IMROZ@IFD.UNI.WROC.PL

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),116-117]

The mechanism of human gallstones formation has not been fully understood. Wide analyses of chemical composition and morphology of the gallstones seem useful to explain this process. In particular: on the surfaces and cross-sections of some gallstones characteristic concentric rings of various colours and chemical composition are observed. It is supposed that the existence of such ring patterns could be explained with Liesegang theory [3] of periodic patterns formation in non-equilibrium conditions.

Human gallstones are composed mainly of cholesterol, proteins, bile pigments (bilirubin and its derivatives) and calcium carbonate. Inorganic admixtures and some biological material (eg. from bacteria) are also observed. Different colours of the gallstones and the existence of ring patterns result from the proportion of their main chemical components. According to one of the gallstone classifications, used for practical purposes, white, brown and black gallstones are distinguished [4]. Gallstones, freshly removed from a gallbladder, have a damp interior and a hard external shell. The structure of the interior is heterogenous. Sometimes, as a result of drying process, the interior may become empty. Coloured rings can be observed in the shell. Detailed analysis of spatial distribution of the components in gallstone should include not only chemical, but also microstructural investigations (i.e. analyses of structural elements like microcrystals, their sizes and spatial positions in the gallstones).

The aim of the presented investigations was to describe differences in structural elements for various gallstones and to observe spatial differentiation of the elements within the same gallstone (differences between the interior and the shell, including the rings of the shell). The measurements were performed with atomic force microscopes Nanoscope E and Nanoscope IIIa, Veeco. We analyzed sizes of structural elements of the gallstones. The relation between the structural elements of given sizes and their spatial distribution within the gallstone was also investigated. We worked mainly in contact mode, but we also discussed advantages and disadvantages of using the AFM tapping mode and phase imaging for gallstones' investigations.

AFM imaging was performed for cross-sections of white, brown and black gallstones. We used fresh and dry gallstones. The surfaces of the cross-sections were non modified, mechanically modified (polished) and chemically modified. The images were taken systematically from the interiors of the gallstones to the external parts of the shells. The results show that the microstructures of gallstones of various types are different. The shells of white gallstones are more homogenous than the shells of brown gallstones. In brown gallstones we observe greater amount of shapeless substance than in white gallstones. Some examples of

do zewnętrznej warstwy skorupy. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić istnienie różnic zarówno pomiędzy kamieniami różnych typów jak i w obrębie tego samego kamienia. Skorupy kamieni białych są mniej zróżnicowane pod względem strukturalnym niż skorupy kamieni brązowych. W kamieniach brązowych występuje wiele substancji bez-

RYS. 1. Różnice w mikrostrukturze pasm występujących na powierzchni przekroju kamienia białego.

FIG. 1. Different parts of a cross-section of a white gallstone imaged with AFM.

postaciowej. Przykłady różnic zaobserwowanych kamienia białego przedstawia RYS.1: w obrębie ciemnego jądra obserwujemy struktury drobne, większe gromadzą się w warstwie zewnętrznej kamienia.

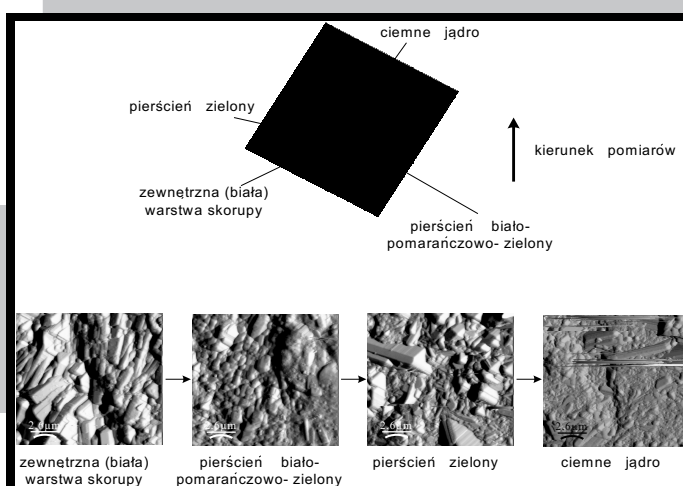
Badanie kamieni żółciowych przy pomocy AFM stwarza trudności pozwalające pogłębić zrozumienie ograniczeń zastosowanej metody pomiarów. Prezentujemy typowe artefakty, które pojawiają się przy obrazowaniu AFM nierównych powierzchni przekroju kamieni.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować prof. dr hab. Piotrowi Szyberowi (Akademia Medyczna we Wrocławiu) za udostępnienie kamieni żółciowych oraz p. dr Jolancie Puniewskiej za okazaną życzliwość.

Piśmiennictwo

- [1] X.S.Zhou, G.R.Shen, J.G.Wu, W.H.Li, Y.Z.XU, S.F.Weng, R.D.Soloway, X.B.Fu, W.Tian, Z.Xu, T.Shen, G.X.Xu, E.Wentrup-Byrne, A spectroscopic study of pigment gallstones in China, *Biospectroscopy*, 3, 371 (1997).
- [2] A.S.Loginov, S.M.Chebanov, A.V.Peterkov, G.V.Saparin, S.K.Obyden, P.V.Ivannikov, Investigation of cholesterol, bilirubin, and protein distribution in human gallstones by color cathodoluminescence scanning electron microscopy and transmission electron microscopy, *Scanning*, 20, 17 (1998).



microstructural differentiation within the same gallstone are presented in FIG.1. Small-sized structural elements are located in the interior of the gallstone. Bigger elements occupy the external part of the shell.

AFM investigations of human gallstones are difficult but fruitful. They lead to deeper understanding the limitations of the method. We present typical artificial effects that may occur during imaging rough surfaces of gallstone cross-sections.

Acknowledgements

The authors thank prof. Piotr Szyber (Wrocław Medical University) for gallstones and dr Jolanta Puniewska for kindness.

References

- [3] Q. Peng, J.-G. Wu, R.D. Soloway, T.-D. Hu, W.-D. Huang, Y.-Z. Xu, L.B. Wang, X.F. Li, W.-H. Li, D.-F. Xu, G.-X. Xu, Periodic and chaotic precipitation phenomena in bile salt system related to gallstone formation, *Biospectroscopy*, 3, 195 (1997).
- [4] O.Kleiner, J.Ramesh, M.Huleihl, B.Cohen, K.Kantarovich, Ch.Levi, B.Polyak, R.S.Marks, J.Mordehai, Z.Cohen, S.Mordechai, A comparative study of gallstones from children and adults using FTIR spectroscopy and fluorescence microscopy, *BMC Gastroenterology* 2, 3 (2002).

OSADZANIE CIENKICH WARSTW Z HYDROKSYAPATYTU METODĄ LASEROWEJ ABLACJI

W. MRÓZ*, B. MAJOR**, R. MAJOR**, A. PROKOPIUK*, T. WIERZCHON***

*INSTYTUT OPTOELEKTRONIKI, WOJSKOWA AKADEMIA TECHNICZNA, 01-489 WARSZAWA, UL. KALISKIEGO 2

**INSTYTUT METALURGII I INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, PAN, 30-059 KRAKÓW, UL. REYMONTA 25

***WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA WARSZAWSKA, 02-507 WARSZAWA, UL. WOŁOSKA 141

Streszczenie

Nowoczesne technologie laserowe, w tym metoda osadzania warstw metodą laserowej ablacji (pulsed laser deposition - PLD), są coraz szerzej wykorzysty-

DEPOSITION OF HYDROXYAPATITE THIN FILMS USING LASER ABLATION METHOD

W. MRÓZ*, B. MAJOR**, R. MAJOR**, A. PROKOPIUK*, T. WIERZCHON***

*INSTITUTE OF OPTOELECTRONICS, MILITARY UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 2 KALISKIEGO STR., 01-489 WARSAW, POLAND

**INSTITUTE OF METALLURGY AND MATERIALS SCIENCE, POLISH ACADEMY OF SCIENCES, 25 REYMONTA STR., 30-059 CRACOW,

***DEPARTMENT OF MATERIALS AND SCIENCE ENGINEERING, WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, 141 WOŁOSKA STR., 02-507 WARSAW, POLAND

Abstract

Modern laser technologies, including layers deposition method by pulsed laser beam (pulsed laser

wane we współczesnej technice [1]. Pełne opanowanie technologii osadzania warstw wymaga lepszego zrozumienia zjawisk fizycznych zachodzących podczas procesów absorpcji promieniowania laserowego i ablacji osadzanych materiałów.

W prezentowanej pracy przedstawiony zostanie wpływ warunków procesu, takich jak: długość fali i fluencja promieniowania laserowego, częstotliwość pracy lasera, temperatura podkładu, typ materiałów podłoża, skład atmosfery reaktywnej i grubość nanoszonych warstw na ich właściwości fizyczne. Prezentowane wyniki bazują na badaniach osadzania warstw hydroksyapatytu (HA) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ z wykorzystaniem lasera ekscimerowego LPX305 firmy LambdaPhysics. Diagnostyka warstw została wykonana za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM).

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),117-119]

Długość fali promieniowania laserowego

W przypadku laserów długofalowych ($10,6\mu\text{m} \pm 0,53\mu\text{m}$), zwiększenie zaś gęstości mocy promieniowania laserowego skutkuje lokalnym wzrostem temperatury elektronowej plazmy ($T_e \sim 10^4 - 20 \text{ eV}$) i część materiału tarczy na granicy ogniska laserowego, w obszarze o niższej temperaturze, przyjmuje postać fazy ciekłej i fazy gazowej. W czasie ablacji pary te ulegają ochłodzeniu i kondensacji, w wyniku czego na powierzchni osadzanego materiału pojawiają się tzw. krople, czyli niepożądane drobiny pogarszające jakość warstw. Dla krótkofalowych laserów ekscimerowych (ArF: $\lambda = 193 \text{ nm}$ i F2: $\lambda = 157 \text{ nm}$), dominującymi mechanizmami absorpcji promieniowania laserowego są absorpcja poprzez poziomy wzbudzone i absorpcja wielofotonowa, nazywane często wspólnie fotoabsorpcją. W przypadku dominacji podczas osadzania warstw procesów fotoabsorpcji i fotoablacji, otrzymuje się gładkie warstwy, bez niepożądanych mikrodropletów, TABELA 1.

Fluencja promieniowania laserowego

Wpływ fluencji promieniowania laserowego jest silnie powiązany z innymi parametrami procesu PLD. Zwiększenie fluencji, niezbędne dla zachowania składu stechiometrycznego nanoszonego materiału, powoduje wzrost klasycznej absorpcji, co z kolei powoduje wzrost temperatury plazmy w otoczeniu ogniska laserowego. Na osadzanych warstwach pojawiają się mikrodroplety, nawet przy osadzaniu warstw promieniowaniem lasera KrF $\lambda = 0,248 \text{ mm}$. Zwiększenie fluencji promieniowania laserowego powoduje również wzrost szybkości ablacji nanoszonego materiału, co przekłada się na wzrost szybkości osadzania warstw oraz wzrost średniej energii kinetycznej osadzanych jonów i atomów. Zwiększenie szybkości osadzania warstw przy zachowaniu niezmiennych pozostałych parametrów termodynamicznych procesu sprzyja nierównowagowemu wzrostowi warstwy, prowadzącemu do jej amorfizacji. Wzrost średniej energii jonów prowadzi do lokalnego wzrostu temperatury podkładu i sprzyja równowagowemu wzrostowi warstwy [2].

Temperatura podkładu

Generalnie przyjmuje się, że osadzana warstwa zaczyna odczuwać w istotny sposób wpływ dyfuzji, jeżeli temperatura podkładu jest rzędu $0,3 \pm 0,4$ temperatury topnienia osadzanego materiału, co w przypadku HAp daje temperaturę rzędu $530 \pm 700^\circ\text{C}$. Przy ustalonej temperaturze podkładu, efektywność oddziaływania dyfuzji na sposób wzrostu warstwy będzie zależeć od energii kinetycznej osadzanych cząsteczek, która z kolei zależy od długości fali lasera i fluencji promieniowania laserowego. Przy osadzaniu warstw z HAp laserem typu Nd:YAG ($\lambda = 1,06 \text{ mm}$), zaob-

deposition (PLD) are widely applied [1]. For full control of deposition technology, better knowledge of physical conditions during absorption of laser radiation and ablation of analysed materials is needed.

This paper presents influence of process conditions like wavelength and fluence of laser beam radiation, laser repetition rate, substrate temperature, target material type, reactive atmosphere composition and thickness of deposited layers, on their physical properties. The presented results are obtained during examination of hydroxyapatite (HA) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ layers, deposited by LPX305 excimer laser of Lambda Physics. A surface topography was measured by atomic force microscope (AFM).

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),117-119]

Laser radiation wavelength

For long-wavelength lasers ($10,6\mu\text{m} \pm 0,53\mu\text{m}$) increase in laser power density causes local increase in electron plasma temperature ($T_e \sim 10^4 - 20 \text{ eV}$) and a part of target material at the laser focus vicinity, in the area of lower temperature, changes into liquid and gas. During vapour ablation, liquid and gas are cooled down and next condensed in form of undesirable droplets on a deposited surface which degrade the layer quality. For short-wavelength excimer lasers (ArF: $\lambda = 193 \text{ nm}$ and F2: $\lambda = 157 \text{ nm}$), absorption through excitation levels and multi-photon absorption are the dominant absorption mechanisms of laser radiation, frequently called "photoabsorption". If layer absorption is dominated by photoabsorption and photoablation, the deposited layers are smooth, without undesirable microdroplets, TABLE 1.

Laser fluence

Influence of the laser radiation fluence is connected with other parameters of the PLD process. Much stronger fluence, needed to maintain the stoichiometric composition of the deposited material, enhanced classical absorption, causing increase in plasma temperature in laser focus vicinity. In consequence, microdroplets appear even for layer deposited with KrF laser ($\lambda = 0,248 \mu\text{m}$).

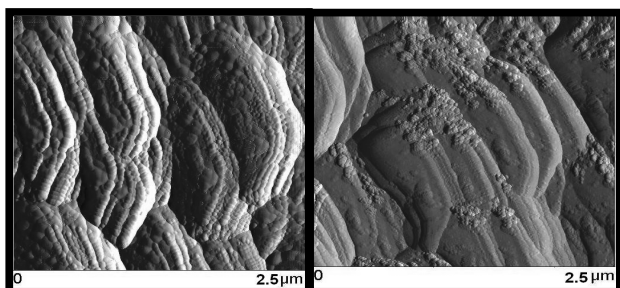
Stronger fluence of laser radiation causes also increase in ablation rate of the deposited material, next increased deposition rate of the layer and higher average kinetic energy of deposited ions and atoms. Increase in deposition rate, with unchanged other thermodynamical parameters, causes a nonequilibrium layer growth, leading to amorphization of a deposited film. Higher average ions energy leads to increase in local temperature of a substrate and equilibrium growth of layers [2].

Substrate temperature

It is generally assumed that a deposited layer starts to be substantially influenced by diffusion process if substrate temperature is of the order of $0,3 \pm 0,4$ of melting temperature of deposited material, i.e. $530 \pm 700^\circ\text{C}$ for HAp. With constant substrate temperature, the diffusion impact on the layer growth will be depended on kinetic energy of deposited particles, depending, in turn, on the laser wavelength and the fluence of laser radiation. During HAp layer deposition with Nd:YAG laser ($\lambda = 1,06 \text{ mm}$), crystallization process has been observed already at the temperature of 250°C [3].

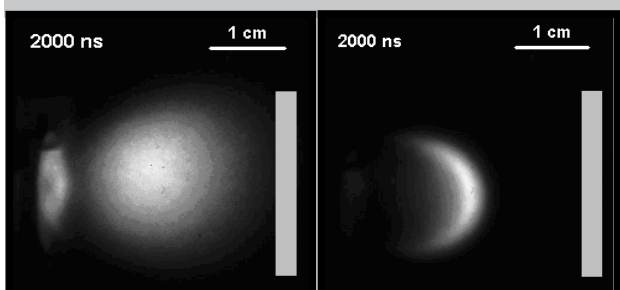
Laser frequency

Increased laser frequency results in increased layer deposition rate, but - unlike in the case of increase in laser fluence - the energy of particles does not change. The atoms have a shorter time to find a places with the lowest free energy



RYS. 1. Topografia warstwy z HAp na podkładzie ze stopu Ti6Al4V (laser ArF, fluencja $F \approx 8 \text{ J/cm}^2$, $p \sim 3 \cdot 10^{-1} \text{ mbar}$), a) $f=5 \text{ Hz}$, b) $f=50 \text{ Hz}$, widoczne defekty pogorszej jakości narastającej warstwy.

FIG. 1. Topography of z HAp layers on Ti6Al4V substrate (ArF laser, fluence $F \approx 8 \text{ J/cm}^2$, $p \sim 3 \cdot 10^{-1} \text{ mbar}$), a) $f=5 \text{ Hz}$ and b) $f=50 \text{ Hz}$, visible defects deteriorating growing layers.



RYS. 2. Formowanie się plazmy z HAp w różnych atmosferach: a) $p \sim 3 \cdot 10^{-5} \text{ mbar}$, b) $p \sim 3,5 \cdot 10^{-1} \text{ mbar}$, atmosfera pary wodnej.

FIG. 2. Plasma formation from HAp in different atmosphere conditions: a) $p \sim 3 \cdot 10^{-5} \text{ mbar}$ and b) $p \sim 3,5 \cdot 10^{-1} \text{ mbar}$, water vapour.

serwowano początki krystalizacji już przy temperaturze 250°C [3].

Częstotliwość pracy lasera

Zwiększenie częstotliwości pracy lasera powoduje zwiększenie szybkości osadzania warstwy, ale - w odróżnieniu od przypadku zwiększania fluencji promieniowania laserowego - energia cząstek nie ulega istotnej zmianie. Czas pozostający atomom na zajęcie miejsc o niskiej energii swobodnej będzie krótszy, a narastająca w sposób warstwa będzie bardziej podatna na wystąpienie różnego rodzaju błędów w budowie [1], RYS.2.

Atmosfera w komorze eksperymentalnej

Zderzenia cząstekek ekspandującej plazmy z cząsteczkami gazu w komorze mogą mieć zarówno charakter zderzeń sprężystych (wpływających na zmianę kierunku rozlotu plazmy) jak i niesprężystych (zamiana początkowej energii kinetycznej w energię termiczną). Oddziaływania te prowadzą do dysypacji energii kinetycznej osadzanych cząstekek [4], RYS. 2.

Podziękowania

Praca była realizowana w ramach projektów PBZ-KBN-100/T08/2003 oraz 08/PBZ-KBN-082/T08/2002.

Długość fali promieniowania Laser radiation wavelength	Zjawiska fizyczne Physical effects
10,6 $\mu\text{m} \pm 0,53 \mu\text{m}$ ($h\nu$: 0,12 \pm 2,3 [eV])	-dominacja klasycznej absorpcji classical absorption domination -temperatura plazmy 10 – 100eV plasma temperature 10 \pm 100 eV -jonizacja zderzeniowa collissional ionization - widoczne efekty termiczne (droplety, krater z wypływem materiału) visible thermal effects (droplets, crater with outflowing material)
0,53 $\mu\text{m} \pm 0,248 \mu\text{m}$ ($h\nu$: 2,3 \pm 4,99 [eV])	-absorpcja klasyczna classical absorption -absorpcja wielofotonowa multiphoton absorption -absorpcja przez poziomy wzbudzone absorption through exited levels
193nm \pm 153nm ($h\nu$: 4,99 \pm 7,9 [eV])	- absorpcja wielofotonowa multiphoton absorption - absorpcja przez poziomy wzbudzone absorption through exited levels - temperatura plazmy $\sim 1 \text{ eV}$ plasma temperature $\sim 1 \text{ eV}$ - jonizacja przez poziomy wzbudzone absorption through exited levels - minimalizacja efektów termicznych: brak wypływu materiału wokół krateru thermal effects are minimized: craters with steep walls, without visible material outflow - dna kraterów posiada nanostrukturę bottom of craters with nano-structure

TABELA 1. Zjawiska zachodzące przy ablacji różną długością fali promieniowania laserowego.

TABLE 1. Ablation effects connected with different laser radiation wavelengths.

levels, so, the layer structure will be more susceptible to the appearance of various structure errors, FIG. 2 [1].

Atmosphere in experimental chamber

The collisions of expanding plasma particles with reactive gas particles in a chamber can be elastic collisions (influencing the direction of plasma expansion) and nonelastic collisions (conversion of initial kinetic energy of ion particles into thermal energy). These interactions lead to dissipation of kinetic energy of deposited particles [4] FIG. 2.

Acknowledgements

The research was financed from PBZ-KBN-100/T08/2003 and 08/PBZ-KBN-082/T08/2002 projects.

Piśmiennictwo

References

- [1] Applied Physics A: Material Sciences & Processing, vol. 70 No. 4-6 (2004), (Proceedings of 7th COLA, Greece, 2003).
- [2] W. Mróz, "Physics of growth of thin films deposited by laser ablation", Solid State Phenomena vol. 101-102 (2005), pp. 187-196.
- [3] R. Major, W. Mróz, T. Wierzchoń, J.M. Lackner, W. Waldhauser, J. Bonarski, K. Haberk, A. Pawłowski, "Texture and microstructure of HAp thin layers on Ti6Al4V", Proceedings of Symposium on Texture and Microstructure Analysis of Functionally Graded Materials, Kraków, Poland, 2004.
- [4] M. Jedyński, Z. Szymański, W. Mróz, A. Prokopiuk, M. Jelinek, T. Kocourek, "Spectroscopic measurements of plasma plume induced during the laser deposition of the hydroxyapatite", Czechoslovak Journal of Physics, Vol. 54 (2004), Suppl. C, C397-402.

120 ANALIZA SZTYWNOŚCI KOMPOZYTOWEGO STABILIZATORA KOŚCI DŁUGICH

J.FILIPIAK*, R.BĘDZIŃSKI*, J.CHŁOPEK**

*POLITECHNIKA WROCŁAWSKA,
UL ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW

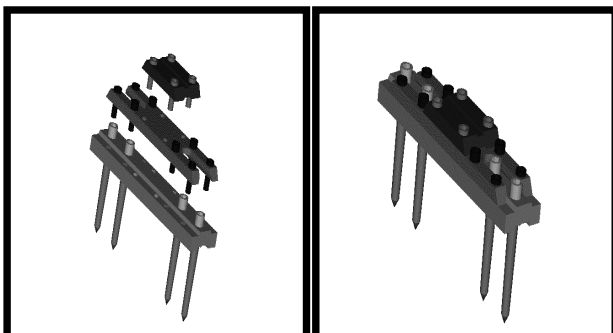
**AKADEMIA GÓRNICZO - HUTNICZA,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW
JAROSŁAW.FILIPIAK@PWR.WROC.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),120-122]

Wprowadzenie

Stabilizatory zewnętrzne kości długich stosowane są w praktyce klinicznej przede wszystkim do leczenia skomplikowanych złamań, a niektóre konstrukcje pozwalają na dokonywanie korekcji osi kończyny, czy też ich wydłużanie. Zadaniem każdego stabilizatora zewnętrznego jest przejęcie funkcji kości w zakresie przenoszenia obciążeń, jakie na nią działają, unieruchomienie odłamów kostnych oraz zapewnienie dynamizacji miejsca zespolenia odłamów. Cechą współczesnych stabilizatorów jest ich "programowa" sztywność zapewniająca dynamizację miejsca zespolenia odłamów, szczególnie w kierunku osiowym [1,5]. W świetle doniesień literaturowych to właśnie przemieszczenia odłamów kostnych, wywołujące określony stan odkształcenia w miejscu zespolenia, są jednym z podstawowych bodźców decydujących o przebiegu procesu powstawania i różnicowania się tkanek w szczelinie międzyodłamowej [2,5,6].

Cel pracy



RYS. 1. Budowa badanego kompozytowego stabilizatora zewnętrznego.
FIG. 1. Structure of the investigated composite external fixator.

W prezentowanej pracy dokonano analizy właściwości mechanicznych kompozytowego stabilizatora zewnętrznego, przeznaczonego do leczenia złamań kości długich kończyn górnych i dolnych. Badany stabilizator zewnętrzny powstał w wyniku współpracy Politechniki Wrocławskiej i Akademii Górniczo-Hutniczej w Krakowie. Jest to jednopłaszczyznowy stabilizator typu klamrowego (RYS.1). Stabilizator zaprojektowano tak, aby możliwa była zmiana jego sztywności w czasie procesu leczenia złamania. Zmiana sztywności stabilizatora w funkcji czasu, leczenia pozwala na dostosowanie podatności konstrukcji stabilizatora do zmieniających się właściwości biomechanicznych tkanek rozwijających się w szczelinie złamania [1,4].

W prezentowanym stabilizatorze zmiana sztywności odby-

MECHANICAL PROPERTIES OF LONG BONE COMPOSITE EXTERNAL FIXATOR

J.FILIPIAK*, R.BĘDZIŃSKI*, J.CHŁOPEK**

*TECHNICAL UNIVERSITY OF WROCŁAW,
UL ŁUKASIEWICZA 7/9, 50-371 WROCŁAW

**AGH-UST UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW
JAROSŁAW.FILIPIAK@PWR.WROC.PL

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),120-122]

Introduction

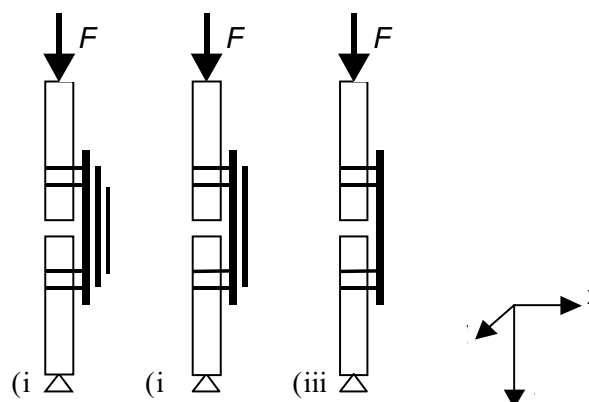
In clinical practice, the external fixators are used in the treatment of complicated fractures and false joints, however some of the fixator constructions are used for correction of limb axis and the elongation of limbs. Regardless of its design, each fixator function is to take over load bearing from the bone. The mark of contemporary external fixators are their define stiffness that to ensure the dynamisation of the bone union site [1,5]. The mechanical properties of the fixator construction determine the displacement of the fragments of the treated bone and the resultant bone regenerate deformity. It is a kind of mechanical signal received by the tissue cells, which is changed into an appropriate chemical signal triggering processes of tissue differentiation [2,5,6].

Research goal

The study presented in this paper is aimed to assess the mechanical properties of composite external unilateral fixator. This fixator is designed for treatment of lower and upper long bone fractures. The project of researched composite external fixator has been result from co-operation of Wrocław University of Technology and AGH-UST in Cracow. The main idea of the described fixator is possibility of change their stiffness in the function of treatment process time. The change of fixator stiffness allow to adapt fixator elasticity to changes as of biomechanical properties of tissues that formation and proliferation takes place in the fracture gap [1,4]. In the present external unilateral fixator the change of stiffness is achieved in a gradual manner on the way of structural elements separation (FIG.1). Structural plates elements characterized by original geometry was made of composite polysulfone with 15 w/o carbon fibres (PSU/CF). Individual elements of fixator are joining by means of screws with metrical thread. Elements of external fixator are connected with bone fragments through screws with normalized bone thread, made of austenitic steel.

Methodology

The research was based on simulation using the FEM. For this purpose the authors developed a simplified model of system: external fixator - bone fragments. The model consists of external fixator structural elements, bone fragments and bone screws joining of fixator with bone fragments. Distance between bone fragments and external fixator plate was determined as 10 mm. For the part modelling fixator elements that made with composite, the authors allow for directionally of mechanical properties which are effect of carbon fibre specific localisation. The bone fragments were modelled as homogenous cylindrical elements.



RYS. 2. Schemat badanych konfiguracji stabilizatora oraz sposób obciążania modelu.
FIG. 2. Schemes of analyzed structure of external fixator and boundary conditions of the models.

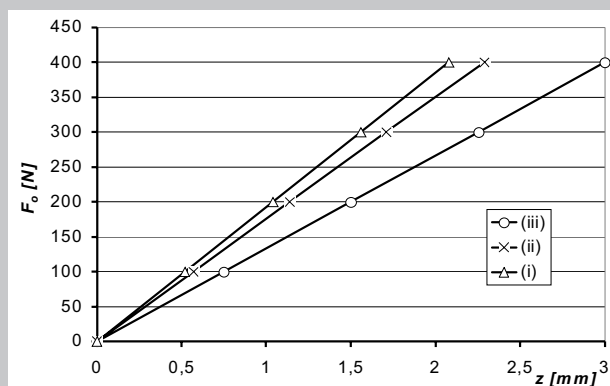
wa się w sposób dyskretny, poprzez odłączanie kolejnych elementów konstrukcyjnych (RYS.1). Poszczególne elementy łączone są za pośrednictwem śrub z gwintem metrycznym. Elementy konstrukcyjne w postaci płytek o specjalnie zaprojektowanej geometrii zostały wykonane z kompozytu na osnowie polisulfonu z dodatkiem 15% włókien węglowych krótkich FT 300 Torayka (PSU/CF). Śruby ze znormalizowanym gwintem kostnym wykonane zostały ze stali austenitycznej.

Metoda badań

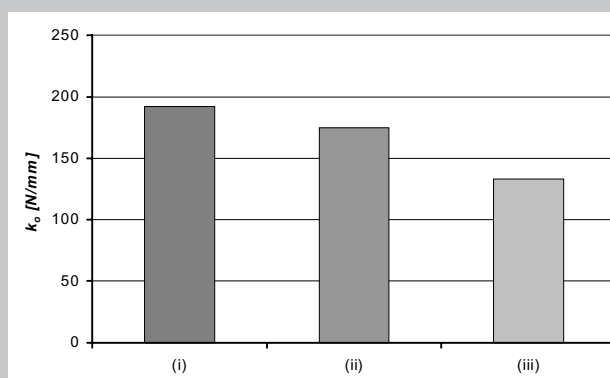
Badania prowadzono na drodze symulacji MES. W tym celu zbudowano model układu: stabilizator - odczepy leczonoj kości. Model składa się z elementów odtwarzających strukturę stabilizatora, śrub kostnych łączących stabilizator z odczypami kostnymi. Rozważano przypadek, gdy stabilizator jest oddalony od kości o 10mm. W przypadku elementów stabilizatora, które wykonane są z kompozytu uwzględniono anizotropowość wynikającą z kierunku ułożenia włókien węglowych. Odczepy kostne zamodelowano jako jednorodne elementy rurowe odwzorowujące trzon kości długiej (RYS.2). Dla elementów strukturalnych modelu przyjęto następujące stałe materiałowe: elementy płytowe stabilizatora - $E=7.7 \cdot 10^3$ MPa, $\nu=0.3$, śruby kostne - $E=2.1 \cdot 10^5$ MPa, $\nu=0.3$, odczepy kostne - $E=1.8 \cdot 10^4$ MPa, $\nu=0.3$. W obliczeniach rozważano następujące przypadki: (i) stabilizator kompletny, (ii) stabilizator po usunięciu jednej płytki, (iii) stabilizator po usunięciu dwóch płytek (RYS.2). We wszystkich przypadkach symulowano obciążenie osiowe, wzdłuż osi elementów modelujących odczepy złamanej kości. Obciążenie przykładano do końca jednego z odczypów. Koniec drugiego odczypu był utwierdzony. Obliczenia przeprowadzono dla obciążeń: 100N, 200N, 300N i 400N.

Wyniki

Na podstawie obliczeń przeprowadzonych dla rozpatrywanych przypadków wyznaczono charakterystyki przedstawiające zmiany siły osiowej F_0 w funkcji przemieszczeń odczypów $z-F_0=f(z)$ - RYS.3. Korzystając z tych charakterystyk wyznaczono współczynniki sztywności osiowej k_0 , (RYS.4) zdefiniowane jako stosunek siły działającej w kierunku pokrywającym się z osią odczypów kostnych do przemieszczenia odczypów kostnych w tym kierunku [3]. Współczynniki sztywności są podstawowymi parametrami opisującymi właściwości mechaniczne stabilizatorów zewnętrznych kości długich.



RYS. 3. Zmiany wartości siły F_0 w funkcji przemieszczenia odczypów kostnych wyznaczone dla analizowanych konfiguracji stabilizatora.
FIG. 3. Relationship of axial force and bone fragments displacement for analysed structures of external fixator.



RYS. 4. Wartości sztywności osiowej k_0 wyznaczone dla analizowanych konfiguracji stabilizatora.

FIG. 4. Values of axial stiffness k_0 determined for analysed structures of external fixator.

For the structural elements of system external fixator - bone fragments authors chose following material constants: plate of fixator - $E=7.7 \cdot 10^3$ MPa and $\nu=0.3$, bone screws - $E=2.1 \cdot 10^5$ MPa and $\nu=0.3$, bone fragments - $E=1.8 \cdot 10^4$ MPa and $\nu=0.3$. In our research we considered three cases: (i) complete fixator, (ii) fixator after one plate dismantle, (iii) fixator after two plates dismantle. All models were subjected to loads simulating the state of axial force F_0 of bone fragments in direction z (FIG.2). The force was applied to the end of one bone fragment. The end of second bone fragment was fixed. The computations involved four different values of such force, i.e. 100N, 200N, 300N and 400N.

Results

On the basis of computer simulation force - displacement characteristics $F_0=f(z)$ for analysed cases were determined (FIG.3). On the basis of these characteristics axial stiffness coefficient k_0 were calculated (FIG.4). Axial stiffness k_0 was define as the ratio of axial force value to bone fragments displacement in direction of the applied load [3]. Coefficients of stiffness are principal parameters mechanical properties of long bone external fixators description.

122 Podsumowanie

Struktura badanego stabilizatora zewnętrznego pozwala na uzyskanie dyskretnej zmiany jego sztywności osiowej. Gdy mamy do czynienia z kompletnym stabilizatorem, przypadek (i), składającym się z trzech kompozytowych płytek połączonych ze sobą, jego sztywność osiowa $k_0=192$ N/mm. Odłączenie płytki zewnętrznej, przypadek (ii), powoduje obniżenie wartości współczynnika k_0 o blisko 9%. Gdy od konstrukcji stabilizatora zostanie odłączona płytka środkowa, przypadek (iii), wówczas sztywność stabilizatora osiąga wartość $k_0=133$ N/mm, co oznacza 24%-owy spadek w porównaniu z przypadkiem (ii) i 31%-owy spadek w porównaniu ze stabilizatorem kompletnym, składającym się ze wszystkich trzech płytek (i).

Przeprowadzone symulacje numeryczne pokazują, że przyjęta koncepcja konstrukcji kompozytowego stabilizatora zewnętrznego pozwala na praktyczne zrealizowanie postulatu zmiennej sztywności stabilizatora w funkcji czasu leczenia złamania. Warto podkreślić, że zastosowanie kompozytu daje wiele korzyści istotnych w praktyce klinicznej. Oprócz uzyskania pożądaných charakterystyk mechanicznych stabilizatora, możliwe jest obniżenie jego masy, a także zwiększa się możliwość wykorzystania techniki rentgenowskiego obrazowania do oceny postępu procesu zrostu kostnego.

Piśmiennictwo

- [1] Będziński R., Filipiak J. (1999): Experimental analysis of external fixators for femoral bone elongation. Acta Bioeng. Biomech., Vol.1, No 2, pp. 93-105.
[2] Claes L.E., Heigele C.A. (1998): Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. J. Biomech., 32, pp. 255-266.
[3] Filipiak J., Mordasiewicz L. (2005): Właściwości biomechaniczne stabilizatora Ilizarowa z hybrydowym układem wszczepów. Chir. Narządu Ruchu i Ortop. Pol. 70 (1), 49-56.

Summary

The design of the investigated composite external fixator allow achieve a gradual change axial stiffness. When we analysed the complete fixator - case (i) - its axial stiffness achieve value $k_0=192$ N/mm. After one plate dismantles, external plate (ii), value of axial stiffness has decreased about 9%. When two plates were separated i.e. external and middle plates (case iii), then axial stiffness achieve value $k_0=133$ N/mm. This means 24 per cent fall in comparison with case (ii) and 31 per cent fall in comparison with complete fixator - case (i).

The obtained results clearly show that composite external fixator idea allow practically execute of postulate variable of fixator stiffness in the function of treatment process time. Its very important that application composite material offer many other essential advantages in medical practice. Aside from adequate mechanical characteristics of external fixator is possible reduce of its weight as well as increase possibility take advantage of X-ray technique to assessment of the bone fracture healing and callus formation progress.

References

- [4] Filipiak J., Ścigała K. (2004): Displacement of bone fragments as a factor determining bone regenerate formation. Engineering of Biomaterials, No. 38-42, pp. 136-138.
[5] Ilizarov G.A.: Transosseus Osteosynthesis. Springer Verlag, 1992.
[6] Prendergast P.J., Huiskes R., Soballe K. (1997): Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces. J. Biomech., Vol. 30, pp. 539-548.

WPŁYW RODZAJU TLENKU GLINU NA WŁAŚCIWOŚCI TWORZYW KORUNDOWYCH NA NOŚNIKI KOMÓREK

ZBIGNIEW JAEGERMANN, SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI,
JOANNA KARAŚ

INSTYTUT SZKŁA I CERAMIKI,
UL. POSTĘPU 9, 02-676 WARSZAWA
BIOCERAMIKA@NEOSTRADA.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),122-124]

Celem prowadzonych prac była ocena właściwości tworzyw korundowych otrzymanych z różnych proszków Al_2O_3 o dużej czystości chemicznej, jako materiałów służących do wytwarzania ceramicznych nośników komórek do zastosowania w inżynierii tkankowej.

Materiały i metody

Do przygotowania tworzyw korundowych zastosowano następujące surowce (TABELA.1):
- tlenek glinu Al_2O_3 RA-207LS firmy Alcan Chemicals Euro

THE INFLUENCE OF THE TYPE OF Al_2O_3 POWDER ON THE PROPERTIES OF SINTERED ALUMINA

ZBIGNIEW JAEGERMANN, SŁAWOMIR MICHAŁOWSKI,
JOANNA KARAŚ

INSTITUTE OF GLASS AND CERAMICS, BIO-CERAMIC DEPARTMENT
9, POSTĘPU STREET, 02-676 WARSAW
BIOCERAMIKA@NEOSTRADA.PL

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),122-124]

The goal of present research consisted in evaluation of properties of alumina materials (based on high-purity Al_2O_3 powders) for cell culture scaffolds used for bone regeneration by tissue engineering method.

Materials and methods

Alumina materials were prepared using the following Al_2O_3 substrates (TABLE 1):
"R" - RA-207LS supplied by Alcan Chemicals
"7" - Nabalox® 713-10 supplied by Nabaltec

Parametr Parameter	[]	„R”	„7”	„6”
Zawartość Al ₂ O ₃ Al ₂ O ₃ content	%	99,8	99,7	99,7
Strata prażenia L.O.I	%	0,2	< 0,5	< 0,3
Zawartość α- Al ₂ O ₃ α- Al ₂ O ₃ content	%	b.d.*	> 95	> 96
Rozwinięcie powierzchni Specific surface	m ² /g	7,5	8,0	5,0
Średnie ziarno d ₅₀ Medium grain size d ₅₀	μm	0,5	0,7	1,6**
* - brak danych, ** - bimodalny rozkład wielkości ziaren * - not available, ** - bimodal grain size analysis				

TABELA 1. Właściwości proszków tlenków glinu (dane katalogowe producentów).

TABLE 1. Properties of Al₂O₃ powders (manufacturer's data).

pe, oznaczony symbolem "R"

- tlenek glinu Al₂O₃ Nabalox® 713-10 firmy Nabaltec, oznaczony symbolem "7"

- tlenek glinu Al₂O₃ Nabalox® 625-31 firmy Nabaltec, oznaczony symbolem "6"

Próbki do badań w postaci belek przygotowano metodą prasowania jednoosiowego i wypalono w temperaturach 1600, 1650 i 1700°C, z szybkością 300°C/h i przetrzymaniem w temperaturze końcowej 60 minut. Gęstość pozorną surowych wyprasek oraz gotowych spieków oznaczono metodą geometryczną, a wytrzymałość oceniano na podstawie wyników trójpunktowego zginania. Obserwacje mikrostruktury tworzyw prowadzone były przy pomocy mikroskopu skaningowego.

Omówienie wyników badań

W przypadku gęstości pozornej wyprasek zwraca uwagę bardzo wysokie zagęszczenie, dochodzące do 2,76 g/cm³ (69,3% gęstości teoretycznej) dla próbek z tworzywa "6" (TABELA 2). Spowodowane jest to bimodalnym rozkładem wielkości ziaren proszku, co umożliwia lepsze wypełnienie przestrzeni w trakcie prasowania. Jednak dopiero

Symbol tworzywa Symbol	Gęstość pozorna wyprasek Green density [g/cm ³]	Temperatura wypalania Sintering temperature [°C]	Skurczliwość wypalania Sintering shrinkage [%]	Gęstość pozorna Apparent density [g/cm ³]	Gęstość względna Relative density [%]	Wytrzymałość na zginanie Compressive strength [MPa]
„R”	2,31	1600	15,8	3,88	97,3	282,5
		1650	16,1	3,91	98,1	243,0
		1700	16,3	3,93	98,6	229,6
„7”	2,34	1600	15,6	3,87	97,1	291,0
		1650	16,1	3,91	98,1	313,2
		1700	16,1	3,93	98,6	300,4
„6”	2,76	1600	10,3	3,77	94,6	232,0
		1650	11,3	3,91	98,1	296,8
		1700	11,6	3,94	98,8	327,1

TABELA 2. Właściwości fizyczne tworzyw korundowych.

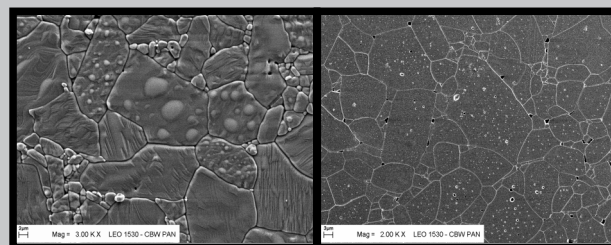
TABLE 2. Physical properties of alumina materials.

"6" - Nabalox® 625-31 supplied by Nabaltec

Testing samples were formed by uniaxial pressing under the pressure of 100MPa. Samples were sintered by pressureless single stage in the temperatures of 1600, 1650 and 1700°C with the rate of 300°C/h in high temperature furnace HT16/18 (Nabertherm). Sintering shrinkage was calculated by comparison of linear dimensions before and after sintering. Green density and apparent density were determined by geometrical method. Relative density was calculated on the basis of polycrystalline alumina theoretical density (3,984 g/cm³). Flexural strength was measured by three-point bending test using "as sintered" samples. For microstructure observations scanning electron microscope LEO 1530 (Zeiss) was applied.

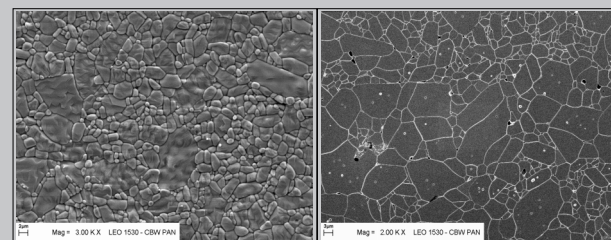
Results

The results of our studies show that the green density of material "6" is very high (2,76 g/cm³) and its shrinkage is low (TABLE 2), according to bimodal grain size analysis of this alumina powder (TABLE 2) what provides better packing of particles during pressing. But only the highest tested temperature - 1700°C ensures high relative density (close to 99%). All the other physical properties of tested materials are comparable. Essential differences can be observed in microstructure of materials, particularly in grain sizes. SEM observations of microstructure of polished and thermally etched samples as well as surface of these materials show that the highest average grain size (5-15μm) characterizes alumina "R" (FIG.1). It could be connected to high purity and high reactivity of alumina powder as well as high sintering temperature, which activates grain growth. Grains of materials "6" and "7" are divided into two sizes. Smaller grains have less than 3μm, and bigger ones between 5 and 10μm (FIGs.2 and 3).



RYS. 1. Obrazy mikrostruktury powierzchni (zdjęcie lewe, pow. 3000x) i zglądu trawionego termicznie (zdjęcie prawe, pow. 2000x) tworzywa "R", wypalonego w temperaturze 1700°C.

FIG. 1. SEM images of the surface (left) and thermally etched sample (right) of alumina "R" sintered in 1700°C.



RYS. 2. Obrazy mikrostruktury powierzchni (zdjęcie lewe, pow. 3000x) i zglądu trawionego termicznie (zdjęcie prawe, pow. 2000x) tworzywa "7", wypalonego w temperaturze 1700°C.

FIG. 2. SEM images of the surface (left) and thermally etched sample (right) of alumina "7" sintered in 1700°C.

najwyższa temperatura wypalania (1700°C) umożliwia otrzymanie po spieczeniu tworzywa o wysokiej gęstości względnej (bliskiej 99%g.t).

Wszystkie tworzywa zbudowane są z dobrze spieczonych ziaren korundowych o różnej wielkości. Tworzywo "R" zbudowane jest głównie z dużych ziaren od 5 do 15 μm (RYS.1). Może to być związane z wysoką reaktywnością surowca korundowego, a także wysoką temperaturą spiekania, co sprzyja rozrostowi ziaren. Natomiast tworzywa "6" i "7" charakteryzuje bimodalny rozkład wielkości ziaren (RYS.2,3). Wyraźnie wyróżnić można ziarna duże (5-10 μm) oraz ziarna drobne o wielkości poniżej 3 μm.

Podsumowanie

Podsumowując tę część badań należy stwierdzić, że wszystkie rodzaje proszków korundowych umożliwiają wytworzenie tworzyw o dobrych właściwościach fizycznych. Różnice między tworzywami są niewielkie i zależą głównie od ciśnienia formowania i temperatury wypalania. Najlepsza temperatura wypalania spośród stosowanych wynosi: dla tworzywa "R" - 1600°C, dla tworzywa "7" - 1650°C a dla tworzywa "6" - 1700°C. Wszystkie otrzymane tworzywa nadają się do wytwarzania nośników do hodowli komórkowych w inżynierii tkankowej.

Podziękowanie

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji w ramach projektu badawczego zamawianego Nr 05/PBZ-KBN-082/2002.06

WPŁYW MODYFIKACJI POWIERZCHNI NA WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE SIATECZEK TYTANOWYCH

HALINA GARBACZ, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA

POLITECHNIKA WARSZAWSKA WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, UL WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA

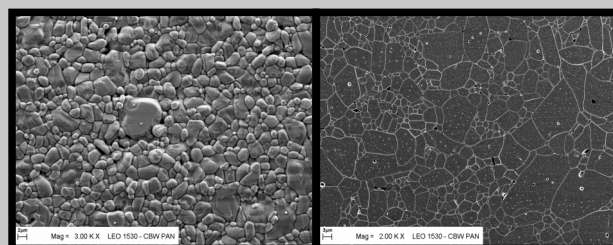
Streszczenie

Celem pracy była analiza wpływu modyfikacji powierzchni na właściwości mechaniczne siateczek tytanowych. Zakres pracy obejmował obserwacje mikrostruktury przy użyciu mikroskopu świetlnego, wraz z opisem stopnia jej jednorodności i wielkości ziarna oraz próby rozciągania prowadzone w temperaturze pokojowej. Stwierdzono, że siateczki tytanowe wykazują anizotropię właściwości mechanicznych, a zastosowana modyfikacja powierzchni roztworem "pirania" obniża granicę plastyczności siateczek.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),124-127]

Wprowadzenie

Tytan jest metalem, który nie ulega degradacji w środowisku organizmu ludzkiego i wykazuje doskonałą biokom-



RYS. 3. Obrazy mikrostruktury powierzchni (zdjęcie lewe, pow. 3000x) i zglądu trawionego termicznie (zdjęcie prawe, pow. 2000) tworzywa "6", wypalonego w temperaturze 1700°C.

FIG. 3. SEM images of the surface (left) and thermally etched sample (right) of alumina "6" sintered in 1700°C.

Summary

As a result of this research it can be stated that good physical properties of alumina materials can be obtained using all of the tested Al_2O_3 powders. The differences between the materials are inconsiderable and mainly depend on sintering temperature. For alumina "R" the best sintering temperature is 1600°C, for the material "7" - 1650°C and for alumina "6" - 1700°C. Cell carriers for tissue engineering could be prepared from all of tested alumina materials, but the results of biological tests of cells culture will be the essential criterion for choosing the best material.

Acknowledgement

This work was supported by the Minister of Science and Information Society Technologies (grant No. 05/PBZ-KBN-082/2002/06).

INFLUENCE OF SURFACE MODIFICATIONS ON MECHANICAL PROPERTIES OF TITANIUM MESHES

HALINA GARBACZ, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA

WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, UL WOŁOSKA 141, 02-507 WARSAW

Abstract

The aim of this paper was an analysis of influence of surface modification on mechanical properties of titanium meshes. The scope of work included light microscope observations of microstructure together with description of the level of its homogeneity and grain size and tensile tests conducted at room temperature. It was determined that titanium meshes reveal anisotropy of mechanical properties, and the applied modification of the surface with piranha solution decreases yield stress of meshes.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),124-127]

Introduction

Titanium is the metal that is not susceptible to degrada-

patybilność w szczególności w stosunku do tkanki kostnej. Jako biomateriał stosowany jest najczęściej w implantacji stawu biodrowego i kolanowego, a także w postaci siateczek w chirurgii twarzoczaszki. Stosunkowo najnowszym obszarem zastosowań dla siateczek tytanowych jest inżynieria tkankowa, gdzie wykorzystywane są one jako rusztowania dla żywych komórek, które umożliwiają rekonstrukcję tkanki kostnej. Dotychczasowe prace dotyczące tytanowych scaffoldów koncentrują się zwłaszcza na opisie wpływu stanu ich powierzchni, jej składu chemicznego i topografii na reakcję żywych komórek [1-3]. Stosowane modyfikacje powierzchni mają głównie na celu zwiększenie adhezji komórek do metalicznego podłoża, co ma istotne znaczenie w aspekcie wykorzystania w inżynierii tkankowej. Z punktu widzenia korzystnego rozwoju komórek kostnych istotnym parametrem jest chropowatość powierzchni siateczek. Jej wpływ na hydrofilowy charakter powierzchni, a w konsekwencji integrację wszczepu z kością był badany w wielu pracach [4-6]. Jednak stan powierzchni ma również wpływ na właściwości mechaniczne materiałów metalicznych. Odgrywa on istotną rolę w przypadku wyrobów o małych wymiarach (a do takich należy zaliczyć siateczki), ponieważ znacząca liczba atomów znajduje się w strefie powierzchni zewnętrznej. Gradient składu chemicznego w warstwie przypowierzchniowej jak również wzrost chropowatości powierzchni wywołany modyfikacją siateczek może być przyczyną niejednorodności odkształcenia plastycznego i w konsekwencji prowadzić do obniżenia wytrzymałości tytanu.

Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie analizy wpływu modyfikacji powierzchni na właściwości mechaniczne siateczek tytanowych.

Materiał i metodyka badań

Materiałem użytym do badań były siateczki z blachy tytanowej o grubości 0.2mm stosowane w chirurgii kostnej. Średnica otworów wynosiła 0.5mm. Mikrostrukturę siateczek obserwowano za pomocą mikroskopu świetlnego i na tej podstawie dokonano analizy jej jednorodności oraz wyznaczono średnią wielkość ziarna. Badania mechaniczne prowadzono na maszynie wytrzymałościowej MTS Qtest/10. Próbkę poddawano próbom rozciągania w temperaturze pokojowej z początkową szybkością 10^{-3}s^{-1} . Następnie analizowano wpływ modyfikacji powierzchni na właściwości mechaniczne siateczek. Modyfikacja polegała na trawieniu w roztworze stężonego H_2SO_4 i 30% H_2O w stosunku objętościowym 1:1 (tzw. roztwór "pirania") przez 4 godziny. Celem tej obróbki było oczyszczenie siateczek tytanowych oraz funkcjonalizacja ich powierzchni poprzez utlenianie i wprowadzenie grup hydroksylowych [6] oraz polepszenia adhezji osteoblastów.

Wyniki badań i dyskusja wyników

W celu oceny wpływu procesu technologicznego na mikrostrukturę, dokonano obserwacji zglądów metalograficznych pochodzących z różnych obszarów siateczek tytanowych. W obszarach wokół wyciętych otworów nie zaobserwowano różnic w mikrostrukturze. Świadczy to o braku wpływu procesu technologicznego - wycinania otworów, na mikrostrukturę gotowych siateczek. Badane próbki wykazywały jednak niejednorodny rozkład wielkości ziarna. Analiza stereologiczna mikrostruktury pokazała, że średnia średnica ekwiwalentna ziarna wynosiła ok. $7\mu\text{m}$. Parametrem, który służy do oceny stopnia jednorodności rozkładu wielkości ziarna jest współczynnik CV. Jego wartość wynosi 0.39 i świadczy o stosunkowo dużym zróżnicowaniu wiel-

tion in the environment of a human organism and it shows perfect biocompatibility, especially towards bone tissue. As a biomaterial it is most commonly used in implantation of hip and knee joints, as well as in form of meshes in the facial bones surgery. A relatively recent area of application of titanium meshes is tissue engineering, where they are used as scaffolding for living cells, which are enable reconstruction of bone tissue. Works conducted so far concerning titanium scaffoldings focus especially on description of the influence of their surface state, chemical composition and topography on reaction of living cells [1-3]. Used surface modifications aim mainly at improvement of cells adhesion to metallic foundation, which is highly significant in the aspect of application in tissue engineering. From the point of view of favourable development of bone cells, the important parameter is roughness of meshes' surface. Its influence on the hydrophilic character of the surface, and in consequence integration of the implant with the bone, was investigated in many papers [4-6]. However, the surface state influences also mechanical properties of metallic materials. It plays an important role in the case of small size products (like meshes), because a significant number of elements is located in the superficial surface area. The gradient of chemical composition in the near-surface layer as well as an increase of surface roughness resulting from modification of the meshes can be the cause of heterogeneity of plastic strain, and in consequence can lead to a decrease of resistance of titanium.

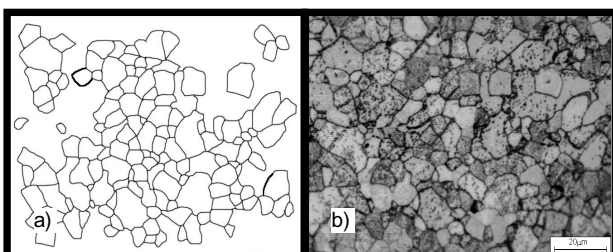
The aim of this paper was to conduct an analysis of the influence of surface modifications on mechanical properties of titanium meshes.

Materials and methods

Materials used for the research were meshes of 0.2mm thick titanium plate used in bone surgery. Diameter of holes equaled 0.5mm. Meshes' microstructure was observed using light microscope, and on this basis analysis of its homogeneity was performed and the average grain size was determined. Mechanical tests were performed using a testing machine MTS Qtest/10. Specimens were subjected to tensile tests at room temperature with initial speed of 10^{-3}s^{-1} . Subsequently, the influence of surface modification on mechanical properties of meshes was analyzed. The modification consisted in etching in solution of concentrated H_2SO_4 and 30% H_2O in vol. ratio 1:1 (the so-called piranha solution) for 4 hours. The aim of this treatment was purifying of the titanium meshes and functionalization of their surface through oxygenation, and introduction of hydroxyl groups [6], and an improvement of osteoblasts adhesion.

Research results and discussion

To evaluate the influence of the technological process on microstructure, observations of metallographic specimens coming from different areas of titanium meshes were conducted. In the areas around the cut out holes no differences in microstructure were observed. That indicates a lack of the influence of the technological process - cutting of holes, on the microstructure of the completed meshes. Examined specimens revealed, however, heterogeneous distribution of grain size. A stereological analysis of the microstructure showed that the equivalent diameter of the grain equaled about $7\mu\text{m}$. The parameter, that serves for evaluation of a degree of grain size distribution, is a CV coefficient. Its value equals 0.39 and indicates a relatively high variation of grain size in microstructure of the examined meshes. The characteristic titanium microstructure,



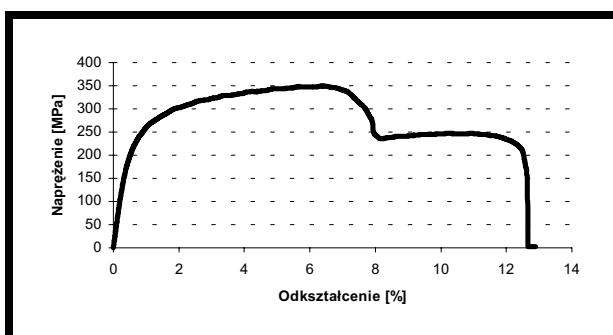
RYS. 1. Przykładowa mikrostruktura siateczki tytanowej (a) wraz z profilem granic ziaren (b).
FIG. 1. Exemplary microstructure of titanium mesh (a) together with grain boundaries profile (b).

kości ziarna w mikrostrukturze badanych siateczek. Charakterystyczną mikrostrukturę tytanu wraz z rozkładem wielkości ziarna przedstawiono na RYS.1 i 2.

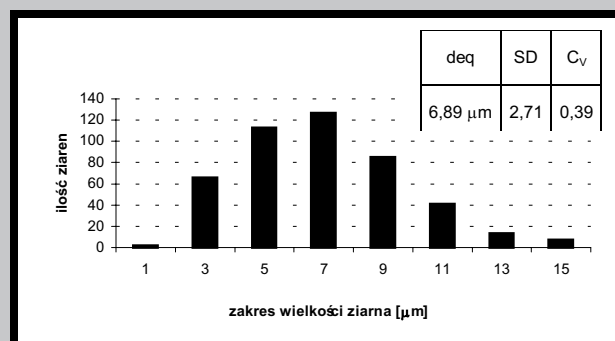
Próby rozciągania prowadzono na próbkach wyciętych z badanych siateczek w dwóch wzajemnie prostopadłych kierunkach. Badaniom mechanicznym poddano po 3 próbki wycięte równolegle do każdego z kierunków. Do analizy wykorzystano średnie wartości uzyskanych parametrów wytrzymałościowych. Przykładowy wykres rozciągania wraz z próbką przed i po próbie rozciągania przedstawiono na RYS.3 i 4.

Specyficzny kształt krzywych naprężenie w funkcji odkształcenia ($\sigma-\epsilon$) wynika z dwuetapowego charakteru procesu rozciągania. Był on wywołany obecnością otworów w analizowanych próbkach. W oparciu o uzyskane wyniki wyznaczono granicę plastyczności $\sigma_{0.2}$ i całkowite odkształcenie względne (TABELA 1). Stwierdzono, że siateczki tytanowe cechują się anizotropią właściwości mechanicznych. Granice plastyczności w dwóch prostopadłych kierunkach różniły się o ok.20%. Anizotropia właściwości mechanicznych siateczek wynika z tekstury krystalicznej kształtującej się podczas procesu walcowania, który był prowadzony na etapie wytwarzania blach tytanowych. Świadomość różnic we właściwościach mechanicznych próbek w zależności od kierunku ich wycięcia jest istotna z punktu widzenia aplikacji tych materiałów w chirurgii. Anizotropii naprężeń uplastyczniających nie towarzyszyły zmiany wielkości odkształcenia rzeczywistego.

Kolejnym etapem badań była analiza wpływu modyfikacji powierzchni na właściwości mechaniczne siateczek. Jak wykazały próby rozciągania prowadzone na próbkach w stanie wyjściowym i po trawieniu w roztworze "pirania" (TABELA 1), próbki o powierzchniach modyfikowanych posiadały granicę plastyczności równą 228MPa, a zatem o ok.12% niższą od próbek nietrawionych. Przyczyn obniżenia właściwości wytrzymałościowych należy poszukiwać w zmianie topografii i mikrostruktury powierzchni, wywołanej trawieniem roztworem "pirania". Jak wykazały wyniki ba-

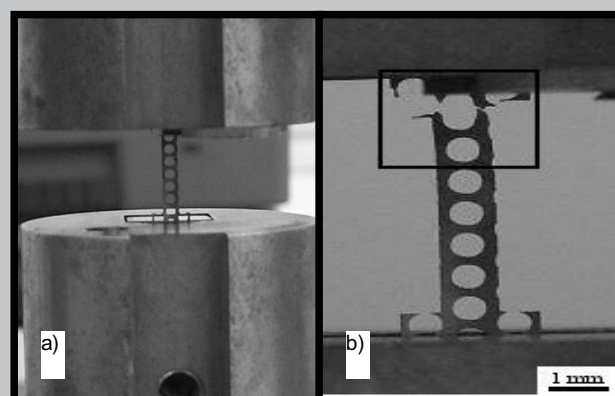


RYS. 4. Przykładowa krzywa rozciągania siateczek tytanowych.
FIG. 4. Exemplary curve of titanium meshes tension.



RYS. 2. Rozkład wielkości ziarna w siateczce tytanowej (deq - średnica równoważna (ekwiwalentna) przekroju ziarna (równa średnicy koła o tej samej powierzchni co dany przekrój), SD-odchylenie standardowe, CV-współczynnik zmienności rozkładu).

FIG. 2. Distribution of grain size in titanium mesh (deq - equivalent diameter (equal to a diameter of a circle of the same area as the given cross section), SD-ratio of standard deviation, CV-coefficient of variation).



RYS. 3. Próbkę wytrzymałościowe wykonane z siateczek tytanowych w stanie przed (a) i po (b) procesie rozciągania.

FIG. 3. Strength test specimens made of titanium meshes in the state before (a) and after (b) tension process.

together with grain size distribution, is presented in FIGs.1 and 2.

Tensile tests were performed on specimens cut out from the examined meshes in two perpendicular directions. Mechanical tests were carried out on 3 specimens at a time cut out in parallel to each of the directions. Mean values of the obtained strength parameters were used for the analysis. An exemplary tension diagram with a specimen before and after tensile test is presented in FIGs.3 and 4.

The specific shape of stress curves in function of strain ($\sigma-\epsilon$) results from two-stage character of the tension process. It was induced by the presence of holes in the analyzed specimens. On the basis of the obtained results yield stress $\sigma_{0.2}$ and total relative strain were calculated (TABLE 1). It was determined that titanium meshes are characterized by anisotropy of mechanical properties. Yield stresses in two perpendicular directions differed by about 20%. Anisotropy of mechanical properties of the meshes results from crystalline texture forming during a rolling process, which was carried out at the stage of manufacturing of titanium plates. The awareness of differences in mechanical properties of the specimens in dependence on direction of their cutting is

Rodzaj modyfikacji	Stan wyjściowy (kierunek I)	Stan wyjściowy (kierunek II)	Trawienie w roztworze pirania (kierunek I)
Type of modification	Initial state (direction I)	Initial state (direction II)	Piranha etching (direction I)
$\sigma_{0.2}$ [MPa]	256	306	228
ε [%]	11	12	10

TABELA 1. Właściwości mechaniczne siateczek tytanowych ($\sigma_{0.2}$ - granica plastyczności, ε - odkształcenie rzeczywiste).
TABLE 1. Mechanical properties of titanium meshes ($\sigma_{0.2}$ - yield stress, ε - strain).

dań [6] trawienie tym roztworem nie wpływa znacząco na chropowatość powierzchni. Powoduje ono jednak pojawienie się w warstwie wierzchniej mikroporowatości, która może być bezpośrednią przyczyną obniżenia wytrzymałości mechanicznej analizowanych siateczek.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że stosowane w chirurgii siateczki tytanowe wykazują anizotropię właściwości mechanicznych. Trawienie roztworem "pirania" zmienia topografię powierzchni a także wzbogaca ją w grupy hydroksylowe co sprzyja adhezji komórek. Jednocześnie powoduje jednak obniżenie granicy plastyczności siateczek tytanowych. Celowe wydaje się zatem kompleksowe badanie wpływu modyfikacji powierzchni siateczek uwzględniające także analizę ich właściwości mechanicznych.

Podziękowanie

Praca badawcza zrealizowana w ramach projektu badawczego zamawianego 5/PBZ-KBN-082/T08/2002.

Piśmiennictwo

- [1] H.L.Holtorf, J.A.Jansen, A.G.Mikos, Ectopic bone formation in rat marrow stromal cell/titanium fiber mesh scaffold: Effect of initial cell phenotype, *Biomaterials* 26 (2005) 6208-6216.
- [2] W.M.J.Vehof, P.H.M.Spauwen, J.A.Jansen, Bone formation in calcium-phosphate-coated titanium mesh, *Biomaterials* 21 (2000) 2003-2009.
- [3] X.F.Walboomers, J.A.Jansen, Bone tissue induction, using a Colloss-filled titanium fibre mesh-scaffolding material, *Biomaterials* 26 (2005) 4779-4785.

IMPEDANCYJNA CHARAKTERYSTYKA ANODOWANEGO TYTANU W BADANIACH IN VITRO

IZABELA GŁAZOWSKA, ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK

UNIwersytet Zielonogórski,
UL. PODGÓRNA 50, 65-246 ZIELONA GÓRA, POLSKA

Streszczenie

W pracy przedstawiono badania impedancyjne tytanu po anodowaniu w roztworze kwasu fosforowego-

significant from the point of view of the application of these materials in surgery. Anisotropy of plastic flow stresses was not accompanied by changes in strain.

Another stage of the research was an analysis of the influence of surface modification on mechanical properties of the meshes. As tensile tests performed on specimens in the initial state and after piranha etching showed (TABLE 1), yield stress for specimens with modified surfaces equaled 228 MPa, which was about 12% less than for unetched specimens. The causes of the decrease of strength properties should be sought in change in topography and microstructure of the surface's microstructure induced by piranha etching. As the research results showed [6], etching with this solution does not significantly influence the surface roughness. However, it brings about appearing of micro-porosity in the superficial area, which can be the direct cause of the decrease of mechanical resistance of the analyzed meshes.

Conclusions

On the basis of the performed investigations it can be stated that titanium meshes applied in surgery reveal anisotropy of mechanical properties. Etching with piranha solution changes surface topography and also it enriches it with hydroxyl groups, which is favourable for cells adhesion. At the same time, however, it brings about a decrease of yield stress of the titanium meshes. Therefore complex research on the influence of mesh surface modification concerning also an analysis of their mechanical properties seems is purposive.

Acknowledgments

Research work realised in the frames of an ordered research project 5/PBZ-KBN-082/T08/2002.

References

- [4] D.D.Deligianni, N.Katsala, S. Ledas, D.Sotiropoluou, J.Amedee, Y.F.Missirlis, Effect of surface roughness of titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption, *Biomaterials* 22(2001) 1241-1251.
- [5] P.Tambasco de Oliveira, A.Nanci, "Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells", *Biomaterials* 25 (2004) 403-413.
- [6] M.Lewandowska, H.Garbac, B.Polak, W.Fabianowski, M.Lewandowska-Szumieł, "Modyfikacje powierzchni siateczek tytanowych przeznaczonych na implanty" *Inżynieria Biomateriałów*. 38-43 (2004) 60-62.

IMPEDANCE CHARACTERISTICS OF ANODIZED TITANIUM IN VITRO

IZABELA GŁAZOWSKA, ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK

UNIVERSITY OF ZIELONA GÓRA,
UL. PODGÓRNA 50, 65-246 ZIELONA GÓRA, POLAND

Abstract

The impedance behaviour of anodized Ti was studied in the simulated physiological solution SBF at tem-

go. Testy impedancyjne prowadzono w symulowanym roztworze soli fizjologicznej SBF w temperaturze 298K. Próbkę poddano anodowaniu galwanostaticznemu w 0,5 M i 2M roztworze H_3PO_4 , przy gęstości prądowej $0,5 \text{ Am}^{-2}$ w czasie 1000 s. Analizę impedancyjną (EIS) prowadzono po 2h oraz po 2, 4, 6 i 8 dniach przechowywania próbek w roztworze SBF. W pomiarach impedancyjnych stosowano impuls zmienny 10 mV o częstotliwości od 10^5 Hz do 0,18 Hz, nakładany na potencjał korozyjny E_{kor} (NEK). Badania wykazały zmiany wielkości impedancji warstw powierzchniowych podczas zanurzenia w SBF w ciągu 8 dni i ujawniły wpływ stężenia kwasu na pojemność i oporność tych warstw.

Słowa kluczowe : tytan, anodowanie, SBF, badania impedancyjne

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),127-130]

Wprowadzenie:

Pasywne warstwy formowane w roztworach kwasu fosforowego na tytanie są bardzo pożądane w zastosowaniach biomedycznych z uwagi na ich biogodność i bioaktywność. Składają się głównie z amorficznego dwutlenku tytanu [1], wykazującego silną adsorpcję anionów fosforanowych [2,3]. Anodowanie w H_3PO_4 może w ten sposób prowadzić do ważnego biologicznie połączenia warstwy tlenku z jonami fosforanowymi [4], które posiadają wysoką zdolność wydzielania apatytu. Cecha ta potwierdza bioaktywność cienkich warstw anodowych. Metody anodowania charakteryzujące się szerokim zakresem parametrów polaryzacji, różnorodnością elektrolitów oraz sposobów przygotowania powierzchni metalu dają w efekcie warstwy różniące się grubością, budową krystaliczną, stechiometrią, właściwościami dielektrycznymi i mechanicznymi [5]. W pracy przedstawiono charakterystykę impedancyjną warstwy apatytu formowanego w roztworze SBF na tytanie poddanym anodowemu utlenianiu w 0.5M i 2M H_3PO_4 .

Materiały i metodyka badań

Eksperymenty prowadzono w trójelektrodowym zestawie do badań elektrochemicznych z nasyconą elektrodą kalomelową (NEK) w charakterze elektrody odniesienia oraz płytką platynową o powierzchni 10 cm^2 jako elektrodą pomocniczą. Warstwy anodowe wytwarzano na prętach wyżarzonego tytanu (α) o średnicy 6mm i długości 20mm [6] (elektrody robocze), poddanych wcześniej szlifowaniu (papier karborundowy 800), polerowaniu i płukaniu w wodzie destylowanej. Próbkę anodowano galwanostaticznie przy gęstości prądowej $0,5 \text{ Am}^{-2}$ w ciągu 1000s w 0,5M i 2M H_3PO_4 . Analizę impedancyjną (EIS) prowadzono po 2h oraz po 2,4,6 i 8 dniach przechowywania próbek w roztworze SBF w temperaturze pokojowej. W pomiarach impedancyjnych stosowano impuls zmienny 10 mV o częstotliwości od 10^5 Hz do 0,18 Hz, nakładany na potencjał korozyjny E_{kor} (NEK). Wszystkie testy elektrochemiczne powtarzano trzy razy. Anodowanie oraz testy impedancyjne przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu elektrochemicznego ATLAS 98 Electrochemical Interface (ATLAS Sollich-Gdańsk Poland), z odpowiednim oprogramowaniem do opracowania i interpretacji wyników metodą nieliniowej metody najmniejszych kwadratów.

Wyniki badań i dyskusja

Diagramy Bode'a pokazują zróżnicowanie charakterystyki impedancyjnej warstw anodowych, zarówno w przypadku zastosowania elektrolitów o różnym stężeniu, jak też

perature 298K. The specimens were anodised in 0.5M and 2M phosphoric acid solutions, at 0.5 Am^{-2} current density for 1000s and then examined by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in SBF solution, with ac impulse of 10 mV, in the frequency range between 10^5 Hz and 0.18 Hz, superimposed to corrosion potential E_{corr} (SCE). Changes of the impedance of surface layers during 8 days immersion in SBF showed the effect of the electrolyte concentration on the capacity and the resistance of these layers.

Key words: titanium, anodisation, SBF solution, impedance

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),127-130]

Introduction

Passive layers formed in solutions of the phosphoric acid on titanium are desirable for biomedical applications due to their biocompatibility and bioactivity. Such layers consisting mainly of amorphous titania [1] show strong adsorption of phosphate anions [2,3]. The anodizing in H_3PO_4 can lead to formation of the biologically important compounds, eg. layer of phosphate ions over the oxide one [4]. The anodic oxidation of titanium in the phosphoric acid solutions produces anatase and/or rutile enriched with phosphates which possess the high ability to create apatite. The formation of the apatite deposits confirms the bioactive character of thin layers produced by this method of anodizing. In anodizing a wide range of parameters of the polarization, variety of electrolytes and various pretreatment surface finishing methods are applied giving in result anodic layer which differ in thickness, crystalline structure, the stoichiometry and dielectric as well as mechanical properties [5].

In the paper impedance characterization in the SBF solution of the apatite layer deposited on titanium anodized in 0.5M and 2M H_3PO_4 has been presented.

Materials and experimental procedure

The experimental work was conducted in a conventional three-electrode cell, with the saturated calomel electrode, placed in the same compartment as the reference and a platinum foil of area 10 cm^2 used as the counter electrode. Anodic layers were produced on annealed rods from titanium (α) 6 mm diameter and 20 mm long [6], earlier being abraded (carborundum 800 paper), polished and rinsed in the redistilled water. The specimens were anodised galvanostatically in 0.5M and 2 M H_3PO_4 at 0.5 Am^{-2} current density for 1000 s. EIS analysis was conducted after 2h, 2,4,6 and 8 days in SBF solution at ambient temperature with an ac signal of 10 mV, of frequency from 10^5 Hz to 0.18 Hz, superimposed to corrosion potential E_{corr} (SCE). In order to obtain the reliable results all electrochemical tests were repeated three times. The impedance data were recorded with ATLAS 98 Electrochemical Interface (ATLAS Sollich-Gdańsk Poland) and interpreted using the non-linear least square fitting procedure.

Results and discussion

Bode's diagrams show the different impedance characteristics of anodic layers, not only with regard to electrolytes concentration, but also during the immersion in the SBF solution. These differences reveal various properties of layers formed in 0.5M and 2 M H_3PO_4 and give evidence on changes of the structure of layers, which occur during

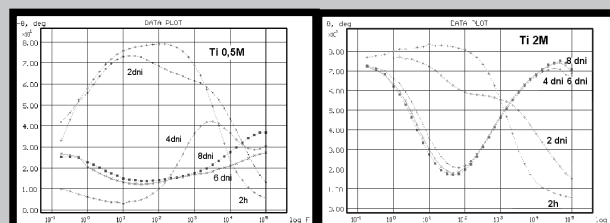
Czas zanurzenia w SBF	R_s [Ωcm^2]		Y_0 [S/cm^2]		α		R_t [Ωcm^2]		C [Fcm^2]	
	0,5M	2M	0,5M	2M	0,5M	2M	0,5M	2M	0,5M	2M
2h	$3,33 \times 10^1$	$3,37 \times 10^1$	$2,89 \times 10^{-6}$	$8,05 \times 10^{-6}$	0,89	0,89	$1,54 \times 10^5$	$1,47 \times 10^6$	$2,61 \times 10^{-6}$	$1,09 \times 10^{-3}$
2 dni	$3,32 \times 10^1$	$3,78 \times 10^1$	$3,58 \times 10^{-6}$	$7,01 \times 10^{-6}$	0,78	0,73	$2,65 \times 10^5$	$6,23 \times 10^{14}$	$3,53 \times 10^{-6}$	$2,58 \times 10^{-2}$
4 dni	$1,62 \times 10^3$	$7,99 \times 10^{-10}$	$1,61 \times 10^{-7}$	$8,20 \times 10^{-6}$	0,66	0,50	$3,05 \times 10^4$	$1,85 \times 10^{15}$	$1,04 \times 10^{-8}$	$1,24 \times 10^{-5}$
6 dni	$3,02 \times 10^{-7}$	$1,82 \times 10^{-9}$	$3,86 \times 10^{-5}$	$7,44 \times 10^{-6}$	0,25	0,49	$7,08 \times 10^4$	$1,53 \times 10^{15}$	$7,88 \times 10^{-8}$	$2,18 \times 10^{-5}$
8 dni	$2,96 \times 10^{-12}$	$3,23 \times 10^{-9}$	$2,07 \times 10^{-5}$	$7,57 \times 10^{-6}$	0,26	0,48	$3,49 \times 10^4$	$1,37 \times 10^{15}$	$8,2 \times 10^{-6}$	$5,36 \times 10^{-5}$

TABELA 1. Zmiany wartości pojemności CPE oraz oporności R_s i R_t w obwodzie zastępczym dla warstw na tytanie rejestrowane podczas 8 dni zanurzenia w SBF.

TABLE 1. Changes of the value of the capacity CPE and resistances R_s and R_t in the equivalent circuit for layers on titanium recorded during immersion in SBF for 8 days

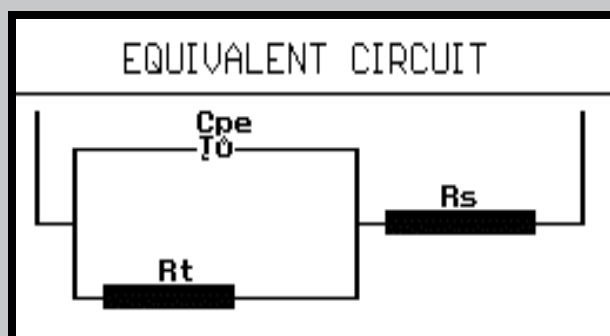
obserwowane podczas przechowywania w roztworze SBF. Różnice te ujawniają nie tylko odmienne cechy warstw formowanych w 0,5 i 2 M H_3PO_4 , ale także świadczą o zmianach struktury warstw badanych próbek zachodzących podczas ich zanurzenia. Wykresy kątowe Bode'a z jednym przebiegiem (jedną stałą czasową), otrzymane w pomiarach prowadzonych podczas pierwszych 48 godzin od zanurzenia w roztworze SBF, zastępują w kolejnych dniach obserwacji (po 4, 6 i 8 dniach) bardziej złożone krzywe z dwiema stałymi czasowymi, a zmiany te mają bardziej zdecydowany charakter w przypadku warstw na tytanie anodowanym w 2M roztworze H_3PO_4 . Wszystkie zmiany zaobserwowane w charakterystyce impedancyjnej warstw, potwierdzają stopniowe (już po 48 godzinach) zastępowanie jednopoziomowej warstwy powierzchniowej dwu-warstwą (RYS.1b) i świadczy o powstawaniu dodatkowej warstwy ponad warstwą tlenkową [7]. Ponadto, w całym okresie obserwacji diagramy Bode (RYS.1) wykazują wyższe kąty fazowe dla próbek anodowanych w 2M roztworze H_3PO_4 , oraz niższe kąty fazowe dla próbek anodowanych w 0,5M roztworze H_3PO_4 . W tym ostatnim przypadku świadczy to o przewadze procesów dyfuzyjnych w warstwie powierzchniowej i znacznej ich porowatości. W wyniku przechowywania w roztworze SBF rośnie także oporność warstw na tytanie (wielkość rzędnych w zakresie wysokich częstotliwości) anodowanym w 2M roztworze H_3PO_4 .

Wyniki pomiarów można dopasować do modelu warstwy przedstawionego za pomocą obwodu zastępczego na rys.2. Wyniki zestawione w TABELI 1 oraz zilustrowane na RYS.3 wskazują, że w przypadku warstw formowanych w 2M roztworze H_3PO_4 już po 2 dniach zanurzenia w roztworze SBF spada oporność elektrolitu w porach na powierzchni warstwy anodowej. Zmianom tym towarzyszy znaczny wzrost zarówno oporności warstwy R_t jak i jej pojemności C , co jednoznacznie potwierdza wytworzenie stabilnej warstwy powierzchniowej. W miarę wydzielania dodatkowej warstwy powierzchniowej na anodowanych materiałach zmienia się także współczynnik α , charakteryzujący odstępstwo elementu CPE od cech idealnego kondensatora. Obniżanie tego współczynnika wskazuje na wzrost niejednorodności i chropowatości warstw [8] podczas przechowywania anodowanych próbek w roztworze SBF.



RYS. 1. Wykresy Bode'a dla próbek Ti anodowanych w 0,5M i 2M H_3PO_4 , zarejestrowane podczas ich przechowywania w roztworze Ringera, w ciągu 8 dni, temp 298 K.

FIG. 1. Bode's spectra for samples of Ti anodized in 0.5M and 2M H_3PO_4 recorded during immersion for 8 days in SBF solution, at 298 K.

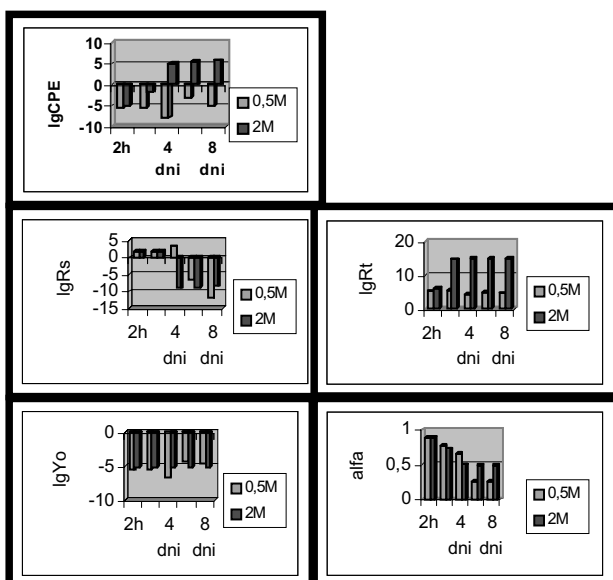


RYS. 2. Obwód zastępczy dla modelu warstw anodowych na tytanie po anodowaniu w H_3PO_4 . CPE-stały element fazowy (pojemność), R_s -oporność elektrolitu, R_t -oporność warstwy.

FIG. 2. The equivalent circuit for the model of anodic layers on titanium after anodizing in H_3PO_4 . CPE-constant phase element (capacitive element), R_s -resistance of the electrolyte, R_t -resistance of the layer

immersion. Angular (q) Bode's graphs with one peak (one time constant), recorded during the first 48 hours from the immersion in the solution SBF, are being replaced during following days of the observation (for 4, 6 and 8 days) by more complex curves with two time constants, and these changes have more pronounced character in case of layers on titanium anodized in 2M H_3PO_4 . All changes observed in the impedance characteristics of layers seen as soon as after 48 hours, indicate gradual transformation of one-level surface layer two-with double-layer structure (Fig.1b) and it confirms the formation of the additional layer over the oxide one [7]. Moreover, during the whole observation period Bode's diagrams (Fig.1) exhibit higher phase angles (q) for samples anodized in 2M H_3PO_4 for samples anodized in 0.5M H_3PO_4 . In the latter case this is an evidence on the dominance of diffusive processes in the surface layer and its significant porosity. The resistance of anodic layers on titanium increases due to the immersion in the SBF solution, particularly in high frequency range. Results of impedance measurements may be fitted to the model of the layer represented by the equivalent circuit in FIG.2.

Results presented in TABLE 1 and illustrated in FIG.3 indicate that in case of layers formed in 2M H_3PO_4 as early as 2 days after immersion in the solution SBF the resistance of the electrolyte in pores on the surface of the anodic layer R_s decreases significantly. This change is accompanied by the significant increase of the two other values: the layer resistance R_t and its capacity C , which univocally confirms that the stable surface layer has been formed. Due to the



RYS. 3. Zmiany wartości pojemności CPE, oporności R_s , R_t oraz współczynnika α w obwodzie zastępczym dla warstw na tytanie rejestrowane podczas 8 dni zanurzenia w SBF.

FIG. 3. The changes of the value of the capacity CPE and the resistances R_s , R_t as well as factor α in the equivalent circuit for the model of anodic layer on titanium recorded during their immersion in SBF solution for 8 days.

Wnioski

Próbki tytanu, anodowane w roztworach H_3PO_4 o stężeniach 0,5M i 2M wykazują zróżnicowanie zarówno charakteryzujących je wielkości pojemności elektrycznej i oporności, jak też zachowania podczas zanurzenia w roztworze SBF. Formowanie warstw anodowych na tytanie w 2 M roztworze H_3PO_4 pozwala na uzyskanie cienkiej warstwy tlenkowej bogatej w fosforany, wykazującej wysoką bioaktywność, czyli zdolność do szybkiego pokrywania się warstwą hydroksyapatytu w roztworach SBF.

MIKROSKOPOWE BADANIA ANODOWYCH WARSTW NA IMPLANTACH TYTANOWYCH STOPÓW ZANURZONYCH W ROZTWORZE SBF

ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK, IZABELA GŁAZOWSKA, MARIUSZ MICHALSKI

UNIwersytet Zielonogórski, Wydział Mechaniczny
ul. Podgórna 50, 65-246 Zielona Góra, Polska,

Streszczenie

Mikroskopową ocenę warstw Ca-O-P osadzonych na próbkach anodowanego tytanu i jego implantowych stopów (Ti6Al4V ELI i Ti6Al7Nb), w sztucznym płynie fizjologicznym badano przy użyciu mikroskopu elektronowego SEM+EDS. Próbki były zanurzone w SBF przez 8 dni, w temperaturze 298K. Przed zanurzeniem próbki mechanicznie szlifowano i anodowano w 0,5M i 2M roztworze kwasu fosforowego.

deposition of the additional surface layer on anodized materials also the factor α , characterizing the deviation of the element CPE from the ideal capacitor, changes. The decrease of this coefficient indicates the increase of the inhomogeneity and the roughness of the layers [8], while they are being immersed in the SBF solution.

Conclusions

Samples of titanium, anodized in H_3PO_4 solutions show different values of the electrical capacity and resistances according to the electrolyte concentration. They differ also in electrochemical behaviour after immersion in the SBF solution. The formation of anodic layers on titanium in 2 M the solution H_3PO_4 leads to formation of thin oxide enriched with phosphate layer. Such bioactive layer is being quickly covered by the layer of hydroxyapatite in SBF solutions.

Piśmiennictwo

References

- [1] J.L. Delplanck and R. Winand, *Eletrochimica Acta*, 33, 11 (1988) 1551-1559.
- [2] C. Sittig, G. Hahner, A. Marti, M. Textor and N. D. Spencer. *J. Mater. Sci.: Mat. in Medicine*, 10 (1999) 191-198.
- [3] C.V. D'Alkaine, L. M. de Souza and F.C. Nart, *Corros. Sci.*, 34, 1(1993)109-49.
- [4] Li Panjian. *J. Am. Ceram. Soc.* 77 (5) 1307-12 (1994).
- [5] E.Krasicka-Cydzik. Formowanie cienkich warstw anodowych na tytanie i jego implantowych stopach w środowisku kwasu fosforowego. Monografia. UZ, Zielona Góra 2003
- [6] ISO 5832-2. Implants for surgery-Metallic materials. Part 2. Unalloyed titanium.
- [7] K. Azumi, N. Yasui, M. Seo, *Corrosion Sci.*, 42 (2000) 885-896.
- [8] H. Ma et al./*Corrosion Science* 45 (2003) 867-882

MICROSCOPIC STUDIES OF ANODIC LAYERS ON TITANIUM IMPLANT ALLOYS IMMERSSED IN SBF SOLUTION

ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK, IZABELA GŁAZOWSKA, MARIUSZ MICHALSKI

UNIVERSITY OF ZIELONA GÓRA,
DEPARTMENT OF MECHANICAL ENGINEERING
ul. Podgórna 50, 65-246 Zielona Góra, Poland,

Abstract

Microscopic examination of Ca-O-P coatings deposited on anodized titanium and its implant alloys samples (Ti6Al4V ELI and Ti6Al7Nb) from simulated body fluid was investigated by using scanning electron microscopy SEM+EDS. Samples were immersed in SBF for 8 days at 298 K. Prior to immersion samples were mechanically polished and anodized in 0.5M and 2M phosphoric acid solutions. SEM and EDS in-

Badania SEM i EDS ujawniły obecność rozproszonych wydzieliń Ca-O-P pokrywających powierzchnię anodowej warstwy na tytanie. Tytan i oba stopy anodowane w 2M kwasie fosforowym były pokryte jednolitą warstwą wydzieliń połączonych z porowatą warstwą na powierzchni.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),130-133]

Wprowadzenie

Zarodkowanie i wzrost fosforanów wapnia na tytanie i jego stopach bada się z powodu ich zastosowania w ortopedii [1-3]. Tytan w sposób naturalny pokryty cienką, naturalną warstwą tlenku [4], może być elektrochemicznie utleniany, aby otrzymać grubsza anodową warstwę amorficznego dwutlenku tytanu. Jednak, kiedy jest anodowany w roztworach kwasu fosforowego, wykazuje silną adsorpcję anionów fosforanowych na powierzchni [5]. Wykazano, że jony fosforanowe na tlenkach tytanu tworzyły korzystne chemiczne połączenie z wapniem podnosząc bioaktywność [6]. A zatem, anodowanie w roztworach kwasu fosforowego może prowadzić do połączenia biologicznie ważnego rodzaju [7, 8] jak i do odporności na korozję i biogodności z tkanką, które indukują wrastanie kości [2, 9], są bardzo pożądane dla medycznych implantów. Zostało stwierdzone również, że zarodkowanie i wzrost warstwy Ca-O-P mogą być wywoływane przez szorstkość podłoża [1] i morfologię anodowej warstwy [6]. Celem obecnych badań jest zbadanie wpływu stężenia elektrolitu oraz podłoża na wzrost warstwy Ca-O-P, podczas zanurzenia w SBF przez pierwsze 8 dni.

Materiały i metodyka

Badano próbki tytanu α , oraz stopów o strukturze ($\alpha+\beta$) (Ti6Al4V, Ti6Al7Nb) [10]. Próbki wycięte z wyżarzanych okrągłych prętów (6 mm średnicy i 20 mm długości), szlifowano na papierach karborundowych 800, płukano w wodzie destylowanej, następnie anodowano galvanostatycznie w 0,5M i 2M H_3PO_4 , przy gęstości prądu $0,5 \text{ Am}^{-2}$ w

vestigations revealed the presence of scattered Ca-O-P deposits covering the surface anodic layer on titanium. Titanium and both alloys anodised in 2M phosphoric acid solution were covered by uniform layers of merged deposits with a porous sub-layer on a surface.

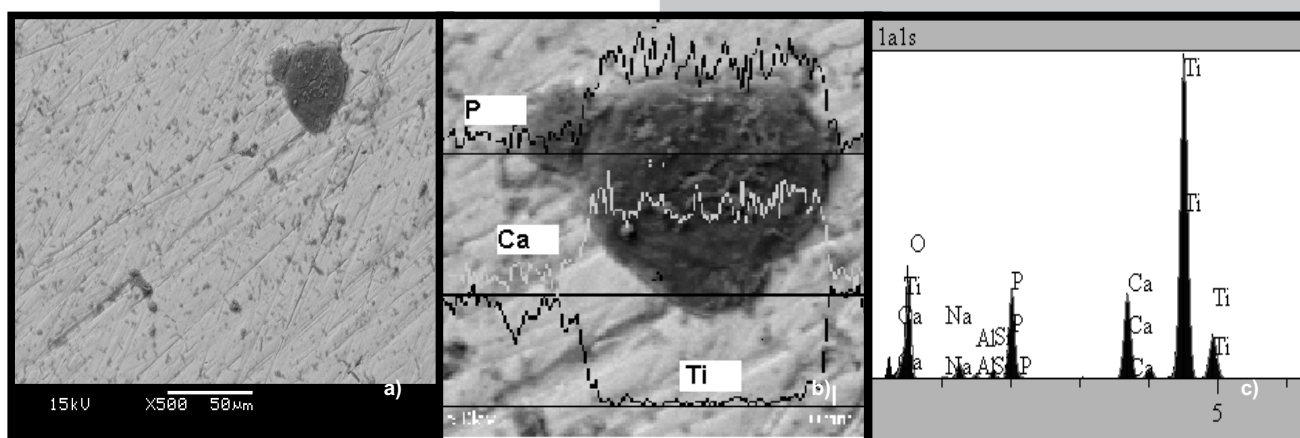
[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),130-133]

Introduction

The nucleation and growth of calcium phosphates on titanium and its alloys have been investigated because of their relevance in orthopaedic applications [1-3]. Titanium naturally covered by a thin, native oxide layer [4], may be electrochemically oxidised to obtain thicker anodic layer of amorphous titanium dioxide layer. However, when anodised in phosphoric acid solutions, it exhibits strong adsorption of phosphate anions into the surface [5]. It has been shown that phosphate ions on titanium oxides favoured the chemical bonding with calcium enhancing the bioactivity [6]. Thus, the anodising in phosphoric acid solutions can lead to incorporation of biologically important species [7, 8] and such, corrosion resistant and compatible to tissue surface layers, which and induce the in-growth of bone [2, 9], are highly desirable for medical implants. It has been found however that nucleation and growth of Ca-P-O films can be affected by the substrate roughness [1] and the anodic layer morphology [6]. The aim of the present study was to investigate the effect of anodic electrolyte concentration and the substrate on growth of Ca-P-O coating during first 8 days of immersion in SBF.

Materials and experimental procedure

The (α) titanium and ($\alpha+\beta$) Ti alloys (Ti6Al4V, Ti6Al7Nb) samples were investigated [10]. The specimens cut off from annealed round rods (6 mm of diameter and 20 mm long), were abraded with silica papers 800, rinsed with redistilled water, then anodised galvanostatically in 0.5M and 2M H_3PO_4 at the current density of $0,5 \text{ Am}^{-2}$ for 1000s. The experi-



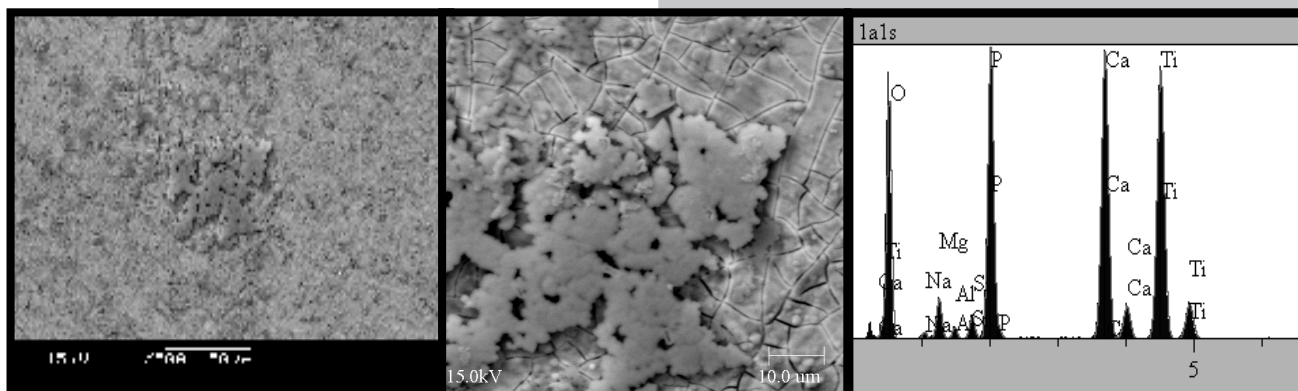
RYŚ. 1. Warstwy powierzchniowe próbek tytanu anodowanego w 0.5M H_3PO_4 po zanurzeniu w roztworze SBF w ciągu 8 dni, w 298 K: a) SEM 500x, b) SEM 2000x-liniowa analiza stężenia P, Ca i Ti c) EDS-analiza na powierzchni obserwowanej próbki na RYŚ. 1b.

FIG. 1. Micrographs of surface layers on anodised samples of Ti in 0.5M H_3PO_4 after immersion for 8 days in SBF solution at 298 K: a) SEM 500x, b) SEM 2000x, linear distribution of P, O and Ti concentrations c) EDS analysis on the whole observed surface of sample in FIG. 1b.

mental work was carried out in a conventional three-electrode cell, with the saturated electrode calomel (SCE), as a reference and a platinum foil of area 10 cm^2 as a counter electrode. SEM observations of surface layers on samples immersed 8 days in SBF solution were carried out with JSM 5600 instrument (15 kV) equipped with EDS analyser.

Results and discussion

SEM observations and EDS microanalysis (FIG.1-4) indicate the presence of deposits dispersed on the surface of anodised titanium and its implant alloys. However, deposits



ciągu 1000s. Badania wykonano w konwencjonalnym trój-elektrodowym ogniwie, z nasycaną elektrodą kalomelową (SCE), jako odniesienia i blaszką platynową o powierzchni 10cm^2 , jako elektrodą pomocniczą. Obserwacje SEM warstw powierzchniowych próbek po 8 dniach w roztworze SBF były wykonywane przy użyciu mikroskopu skaningowego typu JSM 5600, o napięciu przyspieszającym 15 kV, wyposażonego w analizator EDS.

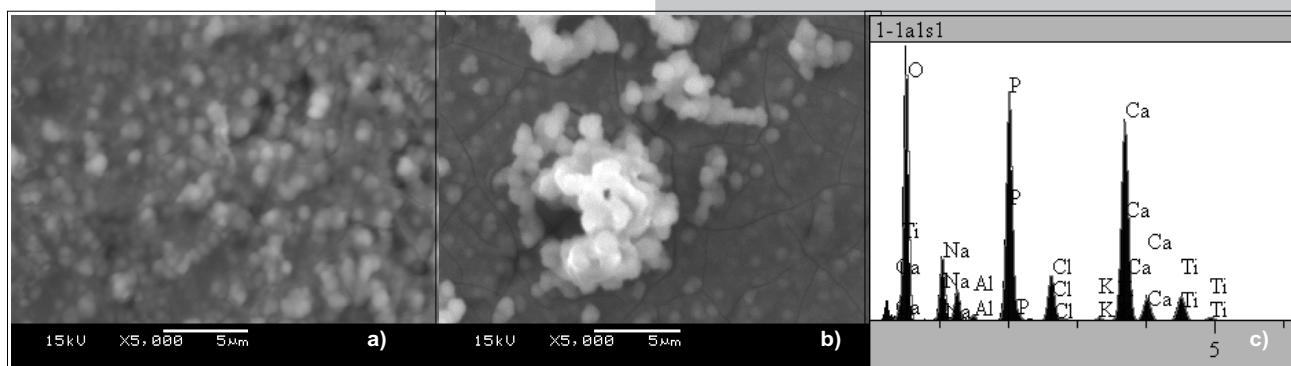
Wyniki i dyskusja

Obserwacje SEM i mikroanaliza EDS (RYS.1-4) wskazują na obecność wydzieliń Ca-O-P rozproszonych na powierzchni anodowanego tytanu i jego implantowych stopów. Jednak, wydzielenia są niejednocznie rozproszone na powierzchni. Tytan i jego dwa stopy anodowane w $0.5\text{M H}_3\text{PO}_4$ są pokryte bardzo cienką warstwą tlenku, która zawiera nieliczne i bardziej rozproszone wydzielenia Ca-O-P (RYS.1a,3a,4a) o różnej średnicy od 200 do 800 nm, sugerując heterogeniczne zarodkowanie Ca-O-P na pokrywającym powierzchnię TiO_2 . Bardziej ciągłe warstwy wydzieliń pokrywających całą powierzchnię są widoczne w przypadku tych samych materiałów, anodowanych w $2\text{M H}_3\text{PO}_4$ (RYS.2,3b,4b). Tytan i stop Ti6Al7Nb wykazują dwuwarstwową strukturę: wewnętrzna warstwa tlenku jest pokryta warstwą mniej równomiernie rozmieszczonych, różnych rozmiarów wydzieliń Ca-O-P. Przeciwnie, stop Ti6Al4V jest pokryty bardziej jednolitą i gęstą warstwą wydzieliń (rys.3b) oraz dużo niższej koncentracji tlenku tytanu na powierzchni. Przy wyższym powiększeniu jest widoczne, że cienka powłoka na tytanie jest ukształtowana z bardziej gładkiej warstwy wydzieliń i rozbitej warstwy tlenków tytanu z fos-

RYS. 2. Warstwy powierzchniowe próbek tytanu anodowanego w $2\text{M H}_3\text{PO}_4$ po zanurzeniu w roztworze SBF w ciągu 8 dni, w 298K : a) SEM 500x, b) SEM 2000x, liniowa analiza stężenia P, Ca i Ti c) EDS-analiza na powierzchni obserwowanej próbki na RYS. 2b.

FIG. 2. Micrographs of surface layers on anodised samples of Ti in $2\text{M H}_3\text{PO}_4$ after immersion for 8 days in SBF solution at 298K : a) SEM 500x b) SEM 2000x c) EDS analysis on the whole observed surface of sample in FIG. 2b.

are non-uniformly dispersed on a surface. Titanium and its two alloys anodised in $0.5\text{M H}_3\text{PO}_4$ are covered with very thin oxide layer, which includes not numerous and more scattered Ca-O-P deposits (FIG.1a,3a,4a) of diameter varied from 200 to 800 nm, suggesting the heterogeneous nucleation of Ca-O-P on TiO_2 covered surface. More continuous films of deposits covering the whole surface is seen in case of the same materials anodised in $2\text{M H}_3\text{PO}_4$ (FIG. 2,3b,4b). Titanium and the Ti6Al7Nb alloy exhibit two-layered structure: the inner oxide layer is covered by an outer layer of more or less uniformly distributed various size Ca-P-O deposits. On contrary the Ti6Al4V alloy is coated by a more uniform and dense layer of deposits (FIG.3b) and much lower concentration of titanium oxide on a surface. At higher magnification it is seen that the film on titanium is formed of more flatter layer of deposits and broken layer of titanium oxides with titanium phosphates, whereas film on both alloys comprise small globules of Ca-O-P. The ratio of Ca/P ranging from 1.26 to 1.42 corresponds to non-stoichiometric hydroxyapatite.

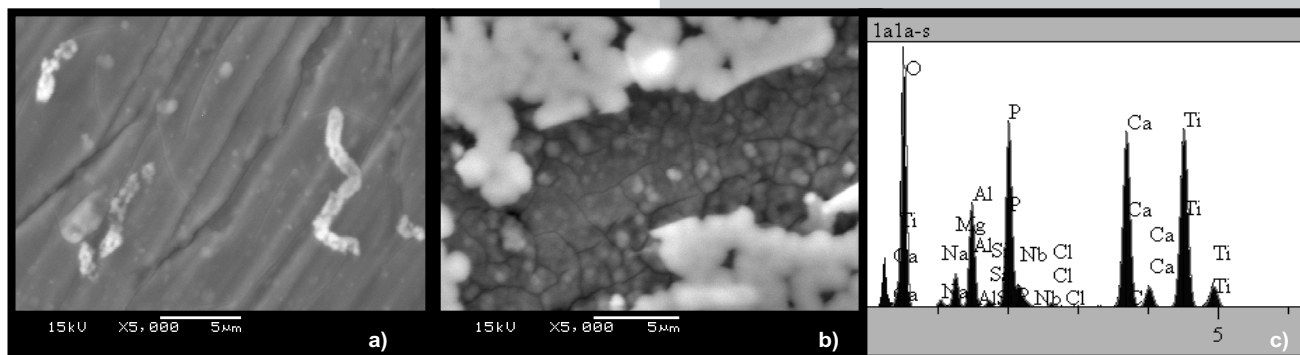


RYS. 3. Warstwy powierzchniowe próbek anodowanego Ti6Al4V x5000 (SEM 5000x) po zanurzeniu w roztworze SBF w ciągu 8 dni, w 298K : a) w $0.5\text{M H}_3\text{PO}_4$, b) w $2\text{M H}_3\text{PO}_4$, c) EDS- analiza na powierzchni obserwowanej próbki na RYS.3b.

FIG. 3. Micrographs of surface layers on anodised samples of Ti6Al4V (SEM 5000x): a) in $0.5\text{M H}_3\text{PO}_4$, b) in $2\text{M H}_3\text{PO}_4$, c) EDS- analysis on the whole observed surface of sample in FIG. 3b.

Conclusions

Specimens of titanium and its implant alloys, anodised in $2\text{M H}_3\text{PO}_4$ solution show different structure in comparison with layers formed in $0.5\text{M H}_3\text{PO}_4$ solutions. Anodizing in $2\text{M H}_3\text{PO}_4$ seems to have catalytic effect on the deposition of Ca-O-P deposits over the oxide layer covering the



foranami tytanu, podczas gdy cienka powłoka na obu stopach zawiera małe kuliste wydzielania Ca-O-P. Stosunek Ca/P wynoszący od 1.26 do 1.42, odpowiada niestechiometrycznemu składowi hydroksyapatytu.

Wnioski

Próbki tytanu i jego implantowych stopów, anodowanych w 2 M roztworze H_3PO_4 wykazują różną strukturę w porównaniu z warstwą uformowaną się w 0.5M roztworze H_3PO_4 . Anodowanie w 2 M H_3PO_4 wywołuje prawdopodobnie katalityczny skutek osadzania wydzielań Ca-O-P ponad warstwą tlenku pokrywającą podłoże. Metoda może być użyta do pokrywania implantowych stopów z dodatkową porowatą warstwą bioaktywnych wydzielań Ca-O-P, warstwą pożądaną dla materiałów implantowych.

RYS. 4. Warstwy powierzchniowe próbek anodowanego Ti6Al7Nb (SEM 5000x): po zanurzeniu w roztworze SBF, w ciągu 8 dni, w 298 K: a) w 0,5M H_3PO_4 , b) w 2M H_3PO_4 , c) EDS-analiza na powierzchni obserwowanej próbki na RYS. 4b.

FIG. 4. Micrographs of surface layers on anodised samples of Ti6Al7Nb (SEM 5000 x): a) in 0,5M H_3PO_4 , b) in 2M H_3PO_4 , c) EDS-analysis on the whole observed surface of sample in FIG. 4b.

substrate. The method may be used to cover implant alloys with additional porous layer of bioactive Ca-O-P deposits, the layer desirable for implant materials.

Piśmiennictwo

- [1] J. Lausma, B. Kasemo, H. Mattson, *Applied Surf. Sci.* 44 (1990) 133.
- [2] T. Hanawa, M. Ota, *Biomaterials*, 12 (1991) 767
- [3] W. Yan, T. Nakamura, M. Kobayashi, H.M. Kim, F. Miyahi, T. Kokubo, *J. Biomed. Mater. Res* 37 (1997) 267.
- [4] J.L. Ong, D.C. Chan, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 28 (2000) 667
- [5] K.E. Heally, P. Ducheyne, *Biomaterials*, 13 (1992) 553-561.

References

- [6] A. Oyne, K. Onuma A. Ito, T. Kokubo, *Bioceramics*, 12 (1999) 157.
- [7] E. Krasicka-Cydzik, I. Glazowska, M. Michalski, *Inżynieria Biomateriałów*, 38-42 (2004) 57.
- [8] Li Panjian, *J. Am. Ceram. Soc.* 77 (5) 1307-12 (1994).
- [9] K. Hayashi, K. Uenoyama, N. Matsuguchi, Y. Sugioka, *J. Biomed. Mater. Res*, Vol. 25 (1991) 515.
- [10] ISO 5832-2. Implants for surgery-Unalloyed titanium. ISO 5832-3. Implants for surgery: Wrought titanium-6 aluminium-4 vanadium alloy. ISO 5832-11. Implants for surgery: Wrought titanium 6-aluminium 7-niobium alloy

STRUKTURA I ODPORNOŚĆ KOROZYJNA AZOTOWANEJ POWIERZCHNI STOPU NiTi DLA ZASTOSOWAŃ MEDYCZNYCH

J.LEŁĄTKO*, P. PAĆZKOWSKI*, T. GORYCZKA*, T. WIERZCHOŃ**, Z. PASZENDA***, H. MORAWIEC*

*UNIWERSYTET ŚLĄSKI, INSTYTUT NAUKI O MATERIAŁACH, 40-007 KATOWICE, BANKOWA 12, POLSKA
JLELATKO@US.EDU.PL

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
02-507 WARSZAWA, WOŁOWSKA 141, POLSKA

***POLITECHNIKA ŚLĄSKA, CENTRUM INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ,
44-100 GLIWICE, AKADEMICKA 2A, POLSKA

[*Inżynieria Biomateriałów*, 47-53,(2005),133-135]

Wprowadzenie

Z powodu licznych zastosowań w przemyśle i w medycynie, stopy NiTi stanowią najważniejszą grupę stopów wy-

SURFACE STRUCTURE AND CORROSION RESISTIVITY OF THE NITRIDED NiTi ALLOYS FOR MEDICAL APPLICATIONS

J.LEŁĄTKO*, P. PAĆZKOWSKI*, T. GORYCZKA*, T. WIERZCHOŃ**, Z. PASZENDA***, H. MORAWIEC*

*UNIVERSITY OF SILESIA, INSTITUTE OF MATERIAL SCIENCE,
40-007 KATOWICE, BANKOWA 12, POLAND,
JLELATKO@US.EDU.PL

**WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
02-507 WARSAW, WOŁOWSKA 141, POLAND

***SILESIAN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, BIOMEDICAL ENGINEERING CENTER, 44-100 GLIWICE, AKADEMICKA 2A, POLAND

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),133-135]

Introduction

Among the shape memory alloys (SMA), NiTi alloys are most important because of their applications in industry and

kazujących efekt pamięci kształtu (SMA). Stopy te cechują korzystne właściwości plastyczne, zmęczeniowe, wysoka odporność korozyjna, wysoka biokompatybilność oraz wysoki współczynnik odzysku kształtu. Z powodu tych właściwości stopy NiTi stają się ważnymi materiałami pozwalającymi przewyższać liczne problemy techniczne i projektowe związane z miniaturyzacją narzędzi medycznych, oferując mniej inwazyjne i mniej traumatyczne zabiegi medyczne, poprzez zastosowania jako: samo rozszerzające się stenty kardiochirurgiczne i urologiczne, druty ortodontyczne czy płytki do leczenia złamań kości [1].

Pomimo licznych wyników pokazujących dobre rezultaty użycia implantów ze stopów NiTi w zastosowaniach klinicznych, wciąż istnieją pewne obawy wystąpienia niepożądanych efektów ubocznych związanych z możliwością uwalniania się jonów niklu długotrwałego stosowania implantów [2]. Polepszenie biokompatybilności tych stopów w wyniku modyfikacji powierzchni rozszerza zakres ich zastosowań. Z tego powodu, dla zwiększenia odporności korozyjnej, często powierzchnia stopu pokrywana jest azotkiem tytanu TiN. Warstwy azotowane charakteryzują się niską reaktywnością chemiczną, wysoką twardością oraz odpornością na ścieranie i korozję [3-5].

W prezentowanej pracy użyto technikę azotowania jarzeniowego do wytwarzania warstw TiN na powierzchni stopów NiTi jako obiecującej metody poprawy biokompatybilności tych stopów.

Eksperyment

Warstwy TiN nanoszono na mechanicznie polerowane płytki stopu NiTi (50,6at.% Ni, $A_r=10^\circ\text{C}$), dostarczonego przez firmę AMT (Belgia). Warstwy azotowane nakładano techniką azotowania jarzeniowego w atmosferze azotu pod ciśnieniem 4 hPa w temperaturze 400°C .

Mikrostrukturę azotowanej powierzchni badano przy użyciu reflektometrii rentgenowskiej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej (JEM 3010). Cienkie folie do badań mikroskopowych wykonano metodą przekrojów poprzecznych poprzez polerowanie jonowe.

Skład chemiczny warstwy wierzchniej został określony metodą EDS. Odporność korozyjna była badana w roztworze Tyroda, przy użyciu metody potencjodynamicznej polaryzacji.

Wyniki

W TABELI 1 umieszczono wartości grubości, chropowatości i gęstości warstwy azotowanej i osnowy. Wartości te wyznaczono przy użyciu reflektometrii rentgenowskiej.

Wyniki tych pomiarów pokazują złożoną strukturę azotowanej powierzchni. Skład fazowy dla każdej warstwy został wyznaczony przy pomocy metody dyfrakcji przy stałym kącie padania wiązki pierwotnej (SKPWP). Warstwa zewnętrzna została zidentyfikowana jako mieszanina azotku TiN oraz tlenków tytanu. Kolejna warstwa zawiera tylko azotek TiN. Zewnętrzna strefa osnowy jest wzbogacona w nikiel oraz zawiera fazę Ni_2Ti . Badania pokazują także, iż powierzchnia warstwy zewnętrznej jest dobrej jakości, o chropowatości rzędu 6,9 nm, oraz posiada dużo niższą gęstość niż osnowa i warstwa azotku.

Na RYS.1 przedstawiono strukturę azotowanej powierzchni stopu. Uzyskane przy pomocy metody TEM obrazy pokazują złożoność mikrostruktury azotowanej powierzchni. Powierzchni ta, o grubości ok. 130 nm, posiada charakter wielowarstwowy. Zewnętrzna warstwa o grubości ok. 80 nm charakteryzuje się budową nanokrystaliczną (A+B na RYS.1) o wielkości ziaren rzędu kilku nm. Obserwacje, przy

medycynie. This is due to the fact that they have superior properties in ductility, fatigue, corrosion and wear resistance, biocompatibility, recoverable strain, etc. Therefore, NiTi alloys have become an important material, which allows overcoming a wide range of technical and designing problems related to the miniaturisation of medical devices and offers less invasive, and thus less traumatic medical procedures, e.g. self-expanding cardiovascular and urological stents, bone fracture fixation plates or orthodontic wires [1].

Despite the fact that most previous studies showed good clinical results of nickel-titanium implants, there is still some concern that freed due to corrosion nickel ions may cause undesirable side-effects [2].

To create new applications and enhance the performance of NiTi alloys, surface modifications are important techniques to improve their biocompatibility. TiN coating due to its low chemical reactivity, high hardness and resistance to wear and corrosion has been adopted for protecting the NiTi surface [3,4].

In the present study, glow discharge nitriding technique was used to produce TiN layer as a prospective technique in surface layers production on the nearly equiatomic NiTi alloys.

Experimental

The flat specimens of the NiTi alloy (50,6at.% Ni, $A_r=10^\circ\text{C}$) delivered by AMT (Belgium) after mechanical polishing were coated with TiN layer. Surface layers were produced by nitriding under glow discharge conditions in 4 hPa nitrogen atmosphere at temperatures 400°C .

The microstructure characterization of the nitrided layer was performed using the X-ray reflectivity (XRR), and transmission (JEM 3010) electron microscope. The cross-section thin foils for the TEM observations were prepared by the ion beam polishing. The chemical composition of the layers was determined by energy dispersive spectrometry.

The corrosion resistance of the nitrided surface was tested in the physiological Tyrod's solution using the cyclic potentiodynamic polarization.

Results

The nitrided layers thickness, surface roughness, density of the nitrided layers and metal matrix, all determined from X-Ray reflectivity measurements, are put together in TABLE 1.

The results of this measurement present a complex structure of the nitrided layers. The phase composition was determined by the X-ray grazing method for each separate layer. The outer layer was identified as the mixture of the TiN nitride and titanium oxides. The following layer contained only the TiN phase (TABLE 1). The outer zone of the matrix is enriched in nickel and contains the Ni_2Ti phase. These

Warstwa Layer	Grubość Thickness [nm]	Chropowatość Surface roughness [nm]	Gęstość Density [g cm ⁻³]
TiN, tlenki tytanu TiN, titanium oxides	26.4	6.9	2.44
TiN	74.3	11.9	4.57
$\text{Ni}_2\text{Ti} + \text{NiTi}$	-	19.9	6.30

TABELA 1. Wyniki pomiarów XRR.

TABLE 1. The results of the XRR measurements.

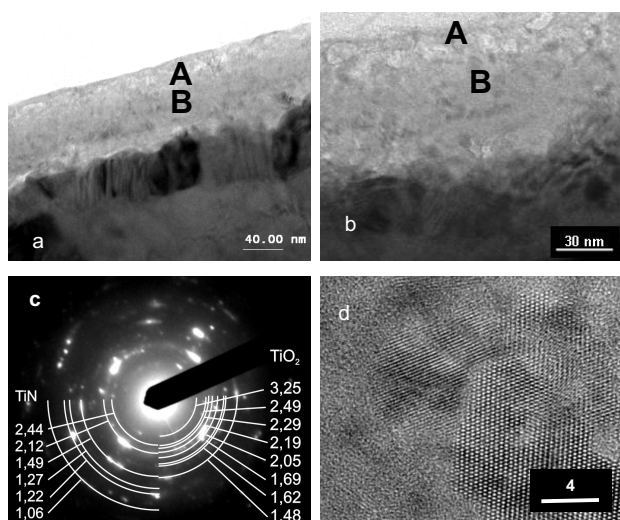


FIG. 1. Mikrostruktura azotowanej powierzchni stopu NiTi: a-mikrostruktura przekroju poprzecznego, b- obraz wysokorozdzielczy, c-obraz dyfrakcyjny uzyskany z warstwy wierzchniej.

FIG. 1. Microstructure of the nitrided layer: a, b-cross-section microstructure of the nitrided surface, c-selected area diffraction pattern, d-HREM image of the layer A.

pomocy wysokorozdzielczej mikroskopii elektronowej, pozwoliły stwierdzić występowanie dużej ilości fazy amorficznej (RYS.1d). Wraz ze zwiększeniem grubości warstwy zawartość fazy amorficznej maleje.

Skład fazowy warstw wierzchnich został określony w oparciu o dyfrakcję elektronów oraz obrazów FFT uzyskanych z obrazów wysokorozdzielczych fazy nanokrystalicznej. Wyniki wskazują, iż warstwy A+B są zbudowane głównie z TiN (RYS.1c). Warstwa A zawiera niewielką ilość tlenku TiO_2 . Tlenek ten został również zidentyfikowany w zewnętrznej warstwie przy pomocy metody SKPWP. Warstwę zewnętrzną charakteryzuje specyficzna budowa. Obserwacje mikroskopowe pokazują istnienie pustek wewnątrz warstwy A, co powoduje obniżenie jej gęstości do $2,44 \text{ g cm}^{-3}$ (TAB. 1). Pomiędzy warstwą azotowaną a osnową istnieje warstwa przejściowa fazy Ni_2Ti o grubości ok. 50 nm i rozmiarach ziaren rzędu 30-40 nm. Wyniki zamieszczone w TABELI 1 oraz obrazy mikroskopowe na RYS.1 pokazują wysoką chropowatość na obu powierzchniach warstwy przejściowej.

Pomiary korozyjne wskazują na wysoką odporność korozyjną azotowanych próbek. Ustalono wartości wynoszące odpowiednio: $E_{\text{kor}} = -66 \text{ mV}$, potencjał przebicia $E_{\text{br}} = +2143 \text{ mV}$. Wartości te są dwa razy lepsze niż uzyskane dla próbek pokrytych TiO_2 na drodze pasywacji [6].

Wnioski

1. Azotowanie powierzchni stopu NiTi metodą jarzeniową tworzy jednorodną, pod względem grubości, warstwę składającą się głównie z TiN o strukturze nanokrystalicznej
2. Azotowanie powierzchni NiTi tworzy ciekłą warstwę fazy międzymetalicznej Ni_2Ti pomiędzy warstwą zewnętrzną a osnową.
3. Powierzchnia azotowana w temperaturze 400°C wykazuje wysoką odporność korozyjną. Potencjał przebicia, pomierzony w roztworze Tyroda, wynosi $E_{\text{br}} = +2143 \text{ mV}$.

results showed that the outside layer with good quality of the surface (surface roughness 6.9 nm) has the density much lower than the nitride phase and the metallic matrix. The TEM image of the nitrided surface is shown in FIG.1. This image also showed a complex microstructure of the layer, which in fact is a multilayer of the thickness of $\sim 130 \text{ nm}$.

The outer layer, with the thickness of $\sim 80 \text{ nm}$, has a nanocrystalline structure (A+B in FIG.1a,b) with the grain size of several nm. The HRTEM observation shows that in this layer there exists large amount of an amorphous phase (FIG.1d). The decrease of the amorphous phase with the increase of distance from layer surface was observed. The phase composition of the layers was determined by indexing the selected area diffraction patterns and the FFT patterns obtained from the high resolution images. It can be seen that these layers A+B are composed mainly of the TiN phase (FIG.1c). In the layer A small amount of TiO_2 oxide was identified. This oxide was also confirmed in the outer layer using the X-ray grazing method. This layer is characterized by specific morphology. The electron microscopic observation shows the presence of voids inside the layer A. This causes that the measured density of this layer is only 2.44 g cm^{-3} (TABLE 1). Between the nitrided layer and the matrix there exists an intermediate layer of the Ni_2Ti phase with the thickness of $\sim 50 \text{ nm}$ and the grain size of 30-40 nm. The results in TABLE 1 and electron image in FIG.1a shows that this layer has high roughness on both sides.

The corrosion measurement results show the high corrosion resistance of the nitrided samples. The established value were $E_{\text{corr}} = -66 \text{ mV}$ and breakdown potential $E_{\text{br}} = +2143 \text{ mV}$. These values are twice higher than that of TiO_2 layers after passivation [5].

Conclusions

1. The nitriding of the NiTi surface at 400°C using glow discharge method, produces nanocrystalline layers of homogeneous thickness, which consist mainly of the TiN phase.
2. The nitriding of the NiTi produces the thin layer of intermetallic Ni_2Ti phase between the nitride layer and the matrix
3. The nitrided at 400°C layer shows high corrosion resistance. The breakdown potential in the physiological Tyrod's solution was $E_{\text{br}} = +2143 \text{ mV}$

Piśmiennictwo

References

- [1] C.M. Wayman, J. Met., 6 (1980) 129.
- [2] J.Rychänen, Proc. of the third Intern. Conf. on Shape Memory and Superelastic Technologies, California, SMST-2000, p. 251.
- [3] D.Starosvetsky, I.Gotman, Surface and Coatings Technology, 148 (2001) 268-276.
- [4] Ying Fu, Xingfang Wu, Yue Wang, Bin Li, Si-ze Yang, Applied Surface Science, 157 (2000) 167-177.
- [5] D.Starosvetsky, I.Gotman, Biomaterials, 22 (2001) 1853-1859.
- [6] H.Morawiec, J.Lelątko, G.Stergioudis, T.Goryczka, A.Winiarski, P.Pączkowski, Engineering of Biomaterials, 37 (2004) 32-35.

CHARAKTERYSTYKI TRIBOLOGICZNE POLIETYLENU UHMWPE STOSOWANEGO NA WKŁADKI ENDOPROTEZ STAWU KOLANOWEGO

MAREK JAŁBRZYKOWSKI*, ALEKSANDER IWANIAK**, JAN R. DĄBROWSKI*, PIOTR WOJCIECHOWSKI***, DAMIAN KUSZ***

* KATEDRA MATERIAŁOZNAWSTWA, POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, 15-351 BIAŁYSTOK, UL. WIEJSKA 45C

** KATEDRA NAUKI O MATERIAŁACH, POLITECHNIKA ŚLĄSKA, 40-019 KATOWICE, UL. KRASIŃSKIEGO 8

*** KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII NARZĄDÓW RUCHU, ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, 40-635 KATOWICE, UL. ZIOŁOWA 45/47

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań tribologicznych wkładki endoprotezy stawu kolanowego wykonanej z polietylenu UHMWPE. Wkładkę do badań uzyskano po zabiegu reimplantacji, po dwuletnim okresie jej użytkowania. Badania prowadzono na standardowym testerze tribologicznym typu trzpień/tarcza. W pierwszym etapie badań właściwości tribologicznych polietylenowej wkładki wykonano testy w warunkach tarcia technicznie suchego. Następnie przeprowadzono próby tarcia z udziałem naturalnej cieczy stawowej. Z uwagi na zróżnicowany rozkład nacisków panujący na powierzchni polietylenowej wkładki, podczas jej pracy w rzeczywistych warunkach, próbki polietylenu pobrano z różnych miejsc powierzchni roboczej wkładki. Porównawczo wyznaczono właściwości tribologiczne polietylenu z miejsc nieobciążonych. Otrzymane wyniki badań tarcia wskazują na zróżnicowane właściwości tribologiczne badanych próbek.

Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),136-140]

Wprowadzenie

Zmiany zwyrodnieniowe stawów obserwuje się już u pacjentów w wieku około 15 lat. Wraz z wiekiem wzrasta procentowy udział chorych w populacji. U ludzi powyżej 60 roku życia choroba zwyrodnieniowa stawów stanowi 50 - 60 % wszystkich przewlekłych chorób i po schorzeniach układu krążenia jest najczęstszą przyczyną inwalidztwa [1]. Istnieje kilka wypracowanych metod leczenia schorzeń zwyrodnieniowych stawów: począwszy od usprawniania ruchowego, leczenia farmakologicznego, a skończywszy na technikach operacyjnych. Należy jednak zaznaczyć, że obecnie jedynie zastąpienie endoprotezą, chorobowo zmienionego stawu, uwalnia chorego od bólu i przywraca pełną ruchomość stawu oraz daje szansę na powrót do normalnej aktywności życiowej [1,3].

Problem trwałości endoprotez stawu kolanowego dotyczy przede wszystkim ruchomych, współpracujących ze sobą, ich części, które z jednej strony narażone są na tarcie i zmienne, dynamiczne obciążenia, a z drugiej na korozyjne oddziaływanie płynów ustrojowych, między innymi maziowego. Analiza procesów niszczenia zarówno polietylenowej wkładki, jak i zjawisk zachodzących w warstwie wierzchniej części metalowej oraz ich wpływ na niszczenie samej wkładki, powinna wnieść istotny wkład w wyjaśnienie zjawisk biotribologicznych endoprotez stawu kolanowego [4,7].

THE TRIBOLOGICAL PROPERTIES OF A POLYETHYLENE UHMWPE OF AN ENDOPROSTHESIS FOR A KNEE JOINT

MAREK JAŁBRZYKOWSKI*, ALEKSANDER IWANIAK**, JAN R. DĄBROWSKI*, PIOTR WOJCIECHOWSKI***, DAMIAN KUSZ***

* KATEDRA MATERIAŁOZNAWSTWA, POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, 15-351 BIAŁYSTOK, UL. WIEJSKA 45C

** KATEDRA NAUKI O MATERIAŁACH, POLITECHNIKA ŚLĄSKA, 40-019 KATOWICE, UL. KRASIŃSKIEGO 8

*** KATEDRA I KLINIKA ORTOPEDII I TRAUMATOLOGII NARZĄDÓW RUCHU, ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, 40-635 KATOWICE, UL. ZIOŁOWA 45/47

Abstract

The paper presents the results of investigating the tribological properties of a knee joint endoprosthesis insert made of the UHMWPE. The insert was obtained during the procedure of reimplantation from an endoprosthesis used by a patient for a period of two years.

In the first stage of the examination, tests were carried out under conditions of dry friction. Then, friction tests were conducted in the presence of a natural synovial fluid. Since in real conditions the stress distributions throughout the surface of the polyethylene insert vary, polyethylene samples were taken from different areas of the insert's working surface. The tribological properties of polyethylene in areas not subjected to load were determined by comparison.

The results obtained from friction tests indicate diverse tribological properties of the samples investigated, depending on the sampling location.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),136-140]

Introduction

Human joints atrophy is observed even in patients of about 15 years of age. With progressing age, the percentage of patients in the population increases. In patients at the age of over 60, the degenerative joint disease constitutes 50-60% of all chronic diseases and is one of the most frequent causes of disablement, second only to cardiovascular system diseases [1]. There are a few treatment methods for the degenerative joint disease, from improving motor activities and pharmaceutical treatment to operational techniques. However, it should be noted that in the current stage of medical knowledge, it is only the replacement of an ill joint with an endoprosthesis that removes pain and restores full mobility of the joint, giving the patient a chance to return to normal life activities [1,3].

The problem of endoprostheses' durability concerns first of all their mobile parts which are exposed to friction and variable dynamic loads, and at the same time to a corrosive influence of systemic fluids, including synovial fluid. An analysis of wear processes of the polyethylene insert, the phenomena occurring in the surface layer of the metal part, as well as their influence on the wear of the insert itself should contribute in a significant way to explaining the biotribological processes in endoprostheses of the knee joint [4,7].

Materiały i metodyka badań

Do badań wykorzystano endoprotezę po dwu letnim okresie jej użytkowania, pozyskaną po zabiegu reimplantacji. Dla celów badań, z polietylenowej wkładki, pobrano próbki w postaci trzpień. Ponieważ w analizowanym węźle tarcia endoprotezy największemu zużyciu ulega polietylen, właściwości tribologiczne części metalowej implantu pominięto. Z tego powodu, jako przeciwpróbki wykorzystano tarcze ze stali NC6. Parametry materiałowe elementów pary trącej przedstawiono w TABELI 1.

Ponieważ wstępna ocena makroskopowa powierzchni polietylenu wykazała zróżnicowany stopień jego zużycia, próbki do badań wycięto z różnych miejsc roboczej powierzchni wkładki. Badaniom poddano także polietylen z miejsc nieobciążonych. Miejsca pobrania próbek do badań oraz opis badanych powierzchni przedstawiono na RYS.1.

Badania tribologiczne przeprowadzono z wykorzystaniem standardowego testera tarcowego typu trzpień/tarcza (RYS.2.). Celem tych badań była ocena właściwości tribologicznych przygotowanych próbek polietylenu. Należy dodać, że dla celów określenia właściwości użytkowych badanego polietylenu UHMWPE wykonano wstępne testy, w warunkach tarcia technicznie suchego. W dalszej części eksperymentu wykonano badania z udziałem naturalnej cieczy stawowej. Ciecz stawową pobrano od chorego z gonartrozą pierwotną.

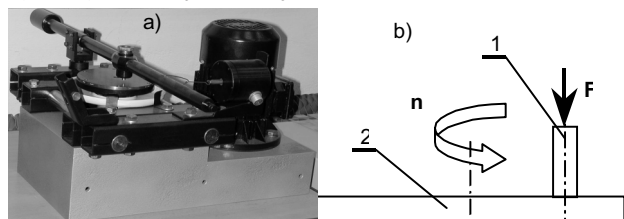
Po wstępnych testach tarcowych ustalono następujące parametry badań: nacisk jednostkowy $p=4, 6, 10, 15$ [MPa], prędkość ślizgania $v=0,15$ [m/s] oraz czas tarcia $t=3, 5, 8$ [h].

Za miarę właściwości tribologicznych polietylenu przyjęto wartość współczynnika tarcia oraz zużycie masowe przygotowanych próbek. Zużycie masowe próbek polietylenu oceniano za pomocą wagi cyfrowej Mettler Toledo typ XS205DV z dokładnością do $1 \cdot 10^{-5}g$.

Wyniki badań i dyskusja

Wyniki badań tarcowych wskazują na zróżnicowane charakterystyki tribologiczne badanych próbek polietylenu. Wykonane testy w warunkach tarcia technicznie suchego wykazały, że wraz ze wzrostem nacisków jednostkowych nastąpił spadek współczynnika tarcia (RYS.3.). Największy współczynnik tarcia uzyskano dla obciążenia jednostkowego wynoszącego 6 [MPa].

Jednocześnie uzyskano odwrotną proporcjonalność w odniesieniu do zużycia masowego próbek. (RYS.4.). Przy maksymalnym obciążeniu węzła tarcia, któremu odpowiada



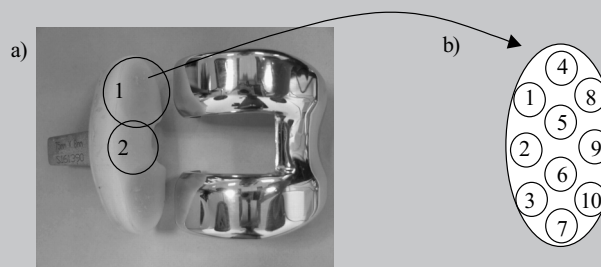
RYS. 2. Aparat trzpień/tarcza: a) widok ogólny urządzenia, b) schemat węzła tarcia; 1, 2 - elementy pary tarcowej (trzpień-polietylen UHMWPE/tarcza-stal NC6).

FIG. 2. Shank/disk tribometer used for the investigation: a) general view, b) diagram of friction area; 1, 2 - components of the friction couple (shank- UHMWPE polyethylene/disk - NC6 steel).

Element pary Friction couple	Oznaczenie/cecha Parameters	
	Materiał Material	Wymiary Size
Próbka (trzpień) Sample (pin)	Polietylen Polyethylene UHMWPE	Ř 4 x 5
Przeciwpróbka (tarcza) Counter samples (disk)	Stal NC6 Steel NC6	Ř 150 x 10

TABELA 1. Parametry materiałowe elementów pary trącej użytych w badaniach.

TABLE 1. Material parameters for the friction couple used in the investigation.



RYS. 1. Endoproteza wykorzystana do badań: a) widok ogólny z zaznaczonymi miejscami pobrania próbek polietylenu: 1-powierzchnia robocza (PR); 2-powierzchnia nieobciążona (swobodna) wkładki (PS); b) miejsca pobrania próbek z powierzchni roboczej wkładki (PR).

FIG. 1. Investigated endoprosthesis of the knee joint: a) general view: 1-working surface (PR); 2-unloaded (free) insert surface (PS); b) polyethylene sampling locations on the insert working surface (PR).

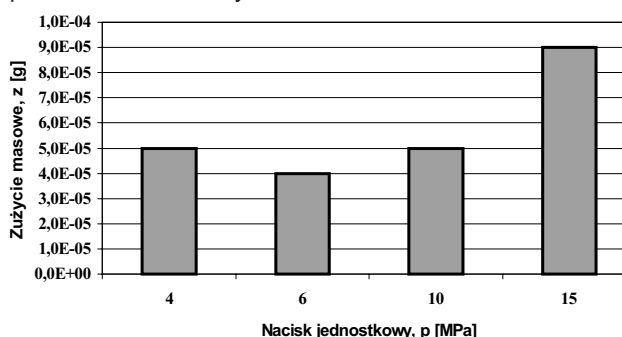
Research materials and methodology

For the investigation, an endoprosthesis after 2 years of use was obtained from a patient during the reimplantation procedure. In order to test friction, shank-shaped samples were taken from the insert. Since in the analyzed endoprosthesis friction area, it is polyethylene that is subject to wear, tribological properties of a metal element of the implant were not taken into account. For this reason, disks used as counter samples were made of NC6 tool steel, i.e. a material of much greater abrasion resistance than polyethylene. Material parameters for elements of the friction couple are presented in TABLE 1.

Since a preliminary macroscopic evaluation of the polyethylene surface indicated a varied degree of its wear, samples for the investigation were cut out from different locations of the insert's working area. Polyethylene from areas not subjected to load was examined as well. The sampling locations and a description of the investigated areas are presented in FIG.1.

Tribological investigations were carried out by means of a standard shank/disk friction testing device (FIG.2.). The purpose of these investigations was to evaluate the tribological properties of the polyethylene samples prepared. It should be noted that in order to recognize operational properties of the UHMWPE after its use, preliminary investigations of dry friction were carried out. In further part of the experiment,

minimalna wartość współczynnika tarcia, uzyskano największą wartość zużycia masowego. Może to być wynikiem mikrodeformacji plastycznych powierzchni czołowej próbki i łatwiejszego jej ścinania, co skutkuje mniejszymi wartościami współczynnika tarcia. Prowadzi to również do wzrostu rzeczywistej powierzchni kontaktu. W efekcie następuje spadek nacisków jednostkowych. Jednak stosunkowo wysokie wartości nacisków destrukcyjnie działają na materiał. Analiza uzyskanych wyników może skłaniać także do wniosku, że istnieje pewna wartość obciążenia, dla analizowanego węzła tarcia, zawierająca się pomiędzy 6 a 10 [MPa], gdzie przy niewielkich oporach ruchu może nastąpić niewielkie zużycie materiału.

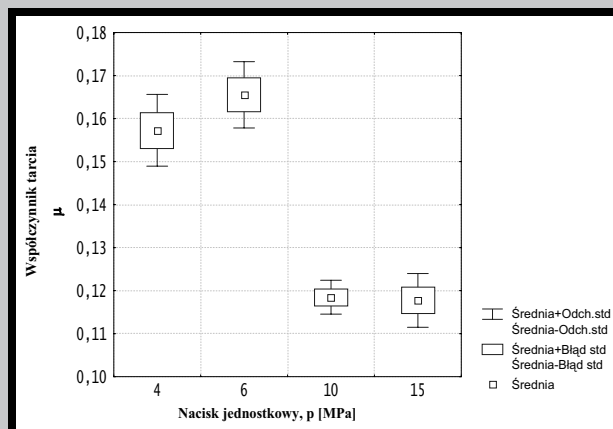


RYS. 4. Zużycie masowe próbek w funkcji nacisków jednostkowych (próbki z powierzchni nieobciążonych - PS, czas tarcia t=5 h).
FIG. 4. Weight consumption of the samples as a function of unit pressures (polyethylene samples taken from unloaded insert surfaces -PS, time=5h).

W drugim etapie badań przeprowadzono testy tribologiczne z udziałem naturalnej cieczy stawowej (CS). Uzyskane dane wskazują, że w przypadku powierzchni nieobciążonych, które można porównać, do materiału wyjściowego (przed operacją implantacji), ciecz stawowa niekorzystnie wpływa na warunki tarcia (PS i PS+CS) (RYS.5.). Może to świadczyć o niepożądanym obecności takiej cieczy w sztucznym stawie z uwagi na trwałość elementów roboczych. W odniesieniu do powierzchni roboczych (PR) polietylenowej wkładki endoprotezy, ciecz stawowa, pomimo, iż była chorobowo zmieniona, zmniejsza opory ruchu. Taki stan może być spowodowany osłabionymi (pierwotnie dużo lepszymi) właściwościami mechanicznymi eksploatowanej już wkładki polietylenowej, co objawia się między innymi mniejszą odpornością na naprężenia ścinające. Obecność cieczy stawowej w takim węźle tribologicznym polepsza warunki tarcia.

Wykonane testy ujawniły, że właściwości tribologiczne badanych próbek zależą, m.in. od miejsca pobrania próbki. Na RYS.6. przedstawiono wyniki pomiaru współczynnika tarcia dla próbek pobranych z miejsc oznaczonych cyfrą 4 i 6 - z powierzchni roboczej wkładki.

W przypadku próbki pobranej z miejsca oznaczonego jako 6 w początkowym etapie testu następuje przyrost wartości współczynnika tarcia. Jednak w dalszym etapie obserwuje się jego spadek do wartości minimalnej, wynoszącej około 0,05. Natomiast dla próbki pobranej z miejsca 4 po początkowym gwałtownym przyroście wartości współczynnika tarcia, następuje najpierw jego stabilizacja na poziomie około 0,15, po czym pod koniec procesu znowu przyrost - do wartości około 0,18. Z przedstawionego wykresu jednoznacznie widać mniej korzystne charakterystyki tribologiczne próbki pobranej z miejsca 4.

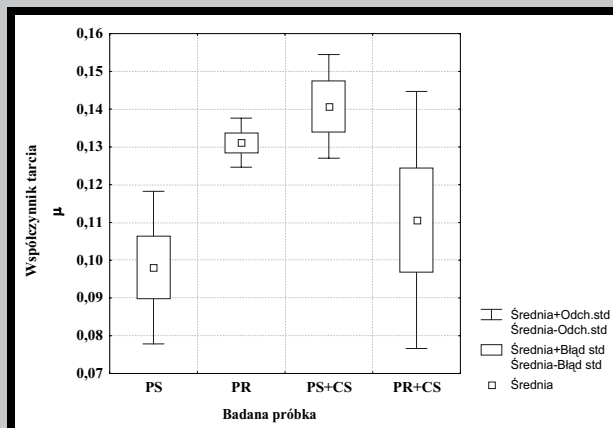


RYS. 3. Wartość współczynnika tarcia w funkcji nacisków jednostkowych (próbki z powierzchni nieobciążonych - PS, czas tarcia t=5 h).

FIG. 3. Value of friction coefficient as a function of unit pressures (polyethylene samples taken from unloaded insert surfaces - PS, time t=5 h).

tests were carried out in the presence of a natural synovial fluid. The synovial fluid was taken from a patient with primary gonarthrosis. After preliminary friction tests, the following investigation parameters were determined: unit pressure $p=4, 6, 10, 15$ [MPa], sliding speed $v=0,15$ [m/s] and friction time $t=3, 5, 8$ [h].

The value of the friction coefficient and weight consumption of the samples taken were assumed as parameters defining the tribological properties of polyethylene. Weight consumption of the polyethylene samples was measured by means of a digital Mettler Toledo type XS205DV scale with an accuracy of $1 \cdot 10^{-5}$ [g].

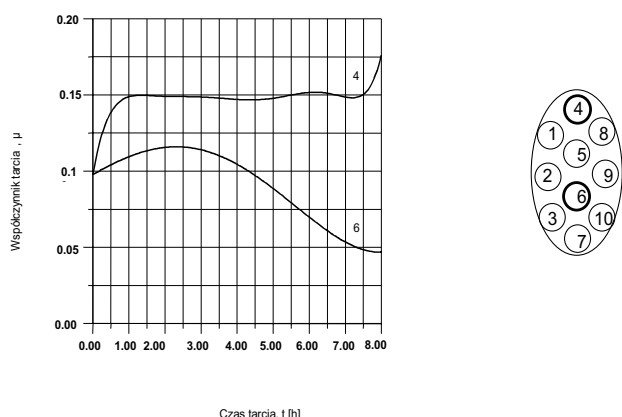


RYS. 5. Porównanie wartości współczynnika tarcia dla próbek polietylenu: PS, PR - tarcie na sucho; PS+CS, PR+CS - tarcie w środowisku cieczy stawowej (czas tarcia t=8h, nacisk jednostkowy p=15 MPa).

FIG. 5. Comparison of friction coefficient values for samples of polyethylene: PS, PR - dry friction; PS+CS, PR+CS - in a synovial fluid environment (time t=8h, unit pressures p=15 MPa).

Investigation results and discussion

The results of friction investigations show varied tribological characteristics of the investigated polyethylene



RYS. 6. Wartości współczynnika tarcia dla próbek pobranych z różnych miejsc powierzchni roboczej wkładki (tarcie w środowisku CS, nacisk jednostkowy $p=15$ MPa).

FIG. 6. Values of friction coefficient in the synovial fluid environment for samples taken from locations marked as 4 and 6, respectively, of the insert working area (friction in a synovial fluid environment CS, unit pressures $p=15$ [MPa]).

Wyniki badań zużycia masowego potwierdzają spostrzeżenia o mniej korzystnych charakterystykach tribologicznych próbki 4. Z wykresu na RYS.7 wynika większe zużycie próbki 4 (o ponad 100 %) w porównaniu do próbki 6. Powyższy fakt, może świadczyć o różnicowanym stopniu destrukcji materiału w różnych miejscach wkładki analizowanej endo-

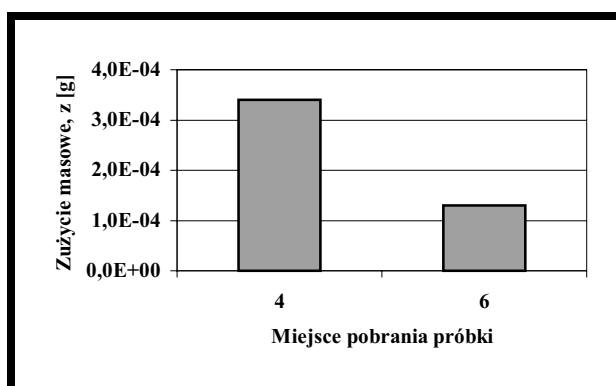


FIG. 7. Results of investigating the weight consumption for samples 4 and 6 (friction in the synovial fluid environment CS, time $t=8$ h, unit pressures $p=15$ [MPa]).

RYS. 7. Wyniki badań zużycia masowego dla próbek 4 i 6 (tarcie w środowisku CS, czas tarcia $t = 8$ h, nacisk jednostkowy $p=15$ MPa).

protezy. Należy dodać, że próbka oznaczona jako 4 została pobrana od strony rzepki, tj. przedniej części stawu, zaś próbka 6 z części tylnej endoprotezy. Na tej podstawie można przypuszczać, że najbardziej narażone na zużycie są obszary przedniej części sztucznego stawu. Ulegają one większemu odkształceniu, a wkładka traci swoje pierwotne właściwości użytkowe, czego potwierdzeniem mogą być wyniki badań tarcia i zużycia próbek pobranych z różnych miejsc wkładki.

Uzyskane w trakcie omówionych badań wyniki należy traktować jako wstępne. Powinny one być punktem wyjścia do dalszych badań. Autorzy zdają sobie sprawę, że dopiero

samples. The tests conducted under dry friction conditions indicated that as unit pressures increased, the friction coefficient fell (FIG.3.). The highest friction coefficient was obtained for a unit pressure of 6 [MPa].

At the same time it was discovered that an increase in unit pressures led to higher weight consumption of the samples (FIG.4). At a maximum load of the analyzed friction area, corresponding to the minimal value of the friction coefficient, the highest weight consumption was obtained. This may be the result of plastic microdeformation of the sample's front area and its easier shearing, which results in lower values of the friction coefficient. It leads to a growth of the actual contact surface and, in consequence, to a decrease in unit pressures. An analysis of the results obtained may lead to a conclusion that there exists a load value for the analysed friction area within 6 and 10 [MPa], where with slight resistance to motion, little wear of the material may be observed. During the second stage of the investigations, tribological tests were carried out in the presence of a natural synovial fluid. The data obtained indicate that in the case of unloaded surfaces, which may be compared to the initial material (before implantation), the synovial fluid adversely affects the friction conditions (FIG.5). This may indicate undesirable presence of such fluid in an artificial joint due to the durability of working parts. As regards the working surfaces (PR) of the polyethylene endoprosthesis insert, the synovial fluid, although pathologically changed, reduces resistance to motion. Such condition may be caused by weakened mechanical properties of the already used polyethylene insert, which manifests itself, inter alia, in lower resistance to shear stress. Presence of the synovial fluid in this friction area improves friction conditions.

The tests conducted have revealed that tribological properties of the investigated samples depend on the sampling location. The friction coefficient assumes different values, depending on the sampling location. In FIG.6, the results of friction coefficient measurements are presented for samples taken from locations marked with 4 and 6 of the insert working area.

For the sample taken from the location marked as 6 the friction coefficient value goes up in the initial stage of investigation. In further stages, however, its value decreases to a minimum of about 0.05. For the sample taken from the location marked as 4, after an initial abrupt increase of the friction coefficient, it stabilizes at about 0.15, and near the end of the process it increases again to ca. 0.18. As can be clearly seen from the chart below, the tribological properties are less favourable for the sample taken from location 4. Also, the weight consumption of sample 4 was by over 100% greater than for sample 6.

The results of investigating the weight consumption confirm the observations concerning less favourable tribological characteristics of sample 4. The chart in FIG.7 indicates greater wear of sample 4 than of sample 6. This fact may indicate a varied degree of material destruction in different parts of the analyzed endoprosthesis insert. It should be mentioned that sample 4 was taken from the area next to the patella, i.e. the front side of the joint, whereas sample 6 from the back part of the endoprosthesis. Based on this information, one can assume that areas of the front part of an artificial joint are most vulnerable to wear. They are subject to greater deformation and the insert loses its original operational properties, the confirmation of which are the results of friction and wear investigations for samples taken from different insert locations.

The results obtained in the investigation discussed should be treated as preliminary ones. They should constitute a starting point for further research. The authors are aware of

bardziej kompleksowe badania, większej ilości materiałów endoprotez, upoważni do formułowania ogólniejszych wniosków.

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników badań i przeprowadzonej analizy można sformułować następujące wnioski:

1. Stwierdzono, że w warunkach tarcia technicznie suchego, wraz ze wzrostem nacisków jednostkowych, następuje spadek wartości współczynnika tarcia i jednocześnie wzrost masowego zużycia próbek. Zwrócono uwagę na możliwość wystąpienia granicznego punktu nacisków jednostkowych, przy którym mogą występować optymalne warunki tarcia, charakteryzujące się minimalnym zużyciem materiału.
2. Wyniki testów z udziałem naturalnej cieczy stawowej (właściwości i skład zmienione przez chorobę zwyrodnieniową) wskazują na jej niekorzystny wpływ podczas tarcia z wykorzystaniem materiału pobranego z powierzchni nieobciążonych. Podczas badań z udziałem próbek pobranych z powierzchni roboczych obserwowano korzystny wpływ tej cieczy na wartości współczynnika tarcia i zużycie masowe próbek.
3. Powierzchnia robocza polietylenowej wkładki podlega zróżnicowanemu warunkom pracy, co przejawia się różnym stopniem jej destrukcji. W badanej endoprotezie obszarem narażonym na największe warunki wymuszeń zewnętrznych jest prawdopodobnie przednia część wkładki, od strony rzepki.
4. Otrzymane wyniki należy traktować jako wstępne i punkt wyjścia do dalszych badań.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2004-2006 jako projekt badawczy nr 3 T08C 029 27.

Piśmiennictwo

- [1] Górecki A.: Problemy leczenia zmian zwyrodnieniowych stawu biodrowego i kolanowego. Dekada kości i stawów 2000-2010, Kraków 2000, 22-32.
- [2] Górecki A.: Alloplastyka stawu kolanowego, Chir. Narz. Ruchu Ortop. Pol., 1998, LXIII supl 1, 84-90.
- [3] Będziński R.: Biomechanika inżynierska. Zagadnienia wybrane, Oficyna wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1997
- [4] Gierzyńska-Dolna M.: Biotribologia, Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa 2002.

the fact that only investigation of a larger amount of experimental material may authorize them to draw more general conclusions.

Conclusions

Based on the investigation results obtained and analyses carried out, one can formulate the following conclusions:

1. It has been found out that while investigating dry friction, with an increase in unit pressure a reduction takes place of the friction coefficient for non-deformed polyethylene, coupled with a simultaneous increase in its weight consumption. At the same time, it was noted that there might exist a boundary unit pressure point, when optimum friction conditions could occur, characterized by minimum material wear.
2. The results of tests in the presence of a natural synovial fluid (properties and composition changed as a result of a degenerative joint disease) indicate its adverse effect during friction of non-deformed polyethylene. In later periods of operation, a favourable influence of the fluid on wear and friction coefficient reduction were noted.
3. The working surface of a polyethylene insert is exposed to diverse operating conditions, which manifests itself in a different degree of its deformation. In the investigated endoprosthesis, the most deformed insert area was the one on the side of the patella. This area is probably subject to the greatest stresses while working.
4. The results obtained in the investigation discussed should be treated as preliminary ones.

Acknowledgements

This work was supported by State Committee of Scientific Research (grant No. 3 T08C 029 27 in years 2004-2006).

References

- [5] J. Cawley, J. E. P. Metcalf, A. H. Jones, T. J. Band, D. S. Skupien: A tribological study of cobalt chromium molybdenum alloys used in metal - on - metal resurfacing hip arthroplasty, Wear, 255 (2003), 999-1006.
- [6] Gierzyńska-Dolna M.: Mechanizm zużycia endoprotezy saneczkowej stawu kolanowego, Biology of Sport 1998, vol. 15, sup. 8, 27-32.
- [7] Ayers D. C.: Maximizing ultra high molecular weight polyethylene performance in total knee replacement, Instr Course Lect. 2001, 50, 421-429.

ANALIZA BIOMECHANICZNA STENTÓW UROLOGICZNYCH

W. KAJZER, J. MARCINIAK

INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH, WYDZIAŁ MECHANICZNY TECHNOLOGICZNY, POLITECHNIKA ŚLĄSKA, UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),141-143]

Wprowadzenie

W urologii stenty wykorzystane są zarówno w celu wyeliminowania zwężeń cewkowych, jak i moczowodowych. Zabieg założenia stentu do cewki moczowej, przy jej okluzji spowodowanej łagodnym rozrostem stercza (BPH), opisał po raz pierwszy Fabian w 1980 roku [1,2]. Zastosowanie stentów w tych przypadkach pozwala uniknąć konieczności niewygodnego dla pacjenta cewnikowania. Aktualnie metoda endoskopowej implantacji stentów przy łagodnym przeroście stercza znalazła zastosowanie w leczeniu zwężeń cewki moczowej, jak również może być przydatna u dzieci przy zwężeniach cewki moczowej, występujących po operacjach jej rekonstrukcji. Innym wskazaniem do implantacji stentu w urologii są łagodne lub nowotworowe zwężenia moczowodów, zwłaszcza pacjentów zakwalifikowanych do leczenia operacyjnego, lecz obciążonych innymi poważnymi schorzeniami [3,4]. Jednocześnie prowadzone są badania zamierzające do radykalnego zmniejszenia ilości powikłań związanych z techniką implantowania. Eksperymentalnie testuje się wiele biomateriałów między innymi o niskiej trombogenności, z których można wytwarzać stenty [5,8].

Metodyka

W celu przeprowadzenia analizy numerycznej wytypowano model geometryczny stentu urologicznego zalecany w praktyce medycznej [9]. W szczególności analizowano samorozprężalny stent urologiczny którego samorozprężalność wynika z postaci konstrukcyjnej stentu jak również z własności mechanicznych biomateriału metalicznego. Geometria bazowała na istniejącym stencie typu UroLume®. W pracy analizowano cechy użytkowe stentów wytwarzanych z różnych biomateriałów, założono zmianę średnicy, nominalnej 14 mm do średnicy umożliwiającej implantację wewnątrz zwężonej cewki moczowej. Na podstawie założonych cech geometrycznych [10] opracowano model geometryczny stentu urologicznego. Stent był siateczką o długości $L=21$ mm i średnicy zewnętrznej $D=14$ mm wykonaną z 24 drutów o średnicy $d=0.3$ mm. Analiza została przeprowadzona dla 3 różnych rodzajów biomateriałów stentu - TABELA 1. Analizowane stenty urologiczne zostały podzielone na elementy skończone typu SOLID 95 - RYS.1. Model został podzielony na 3 części, z których w obliczeniach rozpatrywano część środkową - RYS.2. Dla wszystkich modeli zostały przeprowadzone symulacje zaciśnięcia stentu kolejno o 6, 8 oraz 10 mm na średnicy.

Wyniki

Przykładowy stan naprężeń zredukowanych oraz odkształceń w elementach stentu urologicznego przy założonym przemieszczeniu promieniowym 3 mm przedstawiono na RYS. 3 i 4. Założenie przemieszczenia promieniowe-

BIOMECHANICAL ANALYSIS OF UROLOGICAL STENTS

141

W. KAJZER, J. MARCINIAK

INSTYTUT MATERIAŁÓW INŻYNIERSKICH I BIOMEDYCZNYCH, WYDZIAŁ MECHANICZNY TECHNOLOGICZNY, POLITECHNIKA ŚLĄSKA, UL. KONARSKIEGO 18A, 44-100 GLIWICE

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),141-143]

Introduction

Stents in urology are used either to eliminate narrowing of the urethra or ureter. Stent insertion to urethra, while ureter was narrowed by the Bening Postatic Hyperpalsion (BPH), was described for the first time in 1980 by Fabian [1,2]. The catheterization which is uncomfortable for patient is not necessary when we use stent. Nowadays endoscopic stent implantation method which is used to treat the BPH is also used to treat narrowing of urethra. Stents implantation is also recommended for narrowing or cancerous narrowing of ureter. It is especially useful for patients who are qualified to surgery but with some serious disabilities that make normal operation impossible [3,4]. At the same time, research on radical decrease of complications connected with the implantation technique are conducted. Many biomaterials of low thrombogenicity (designed for stents) are experimentally tested [5,8].

Methods

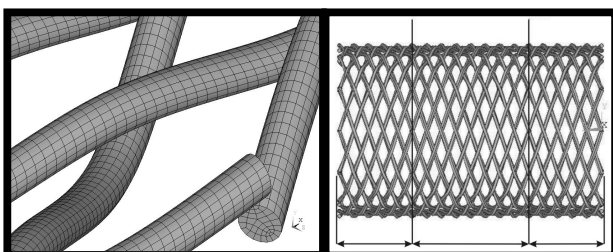
In order to perform numerical analyses a geometrical model of the urological stent (recommended in the clinical practice) was selected [9]. In particular the self-expanding urological stent was analyzed. The ability to self-expanding of the stent results from its construction as well as mechanical properties of the metallic biomaterial. The geometry was based on the existing UroLume® stent. Application features of stents made of different biomaterials were analyzed in the work. The change of the nominal diameter (14 mm) to the implantable diameter (implantation of the stent into the constricted urethra) was set.

On the basis of the applied geometrical features [10] a model of the urological stent was worked out. It was a mesh of $L=21$ mm length and outer diameter $D=14$ mm made of

Biomateriał Biomaterial	Moduł Younga Young's modulus MPa	Liczba Poisson'a Poisson's ratio ν	Granica plastyczności Yield point $R_{p0.2min}$, MPa
Nitinol (SE 508 WIRE) [11]	58000	0.3	1150
Stal austenityczna Stainless steel Cr-Ni-Mo (AISI 316L) [12]	200000	0.33	690
Stop kobaltu Cobalt alloy (L605) [13]	243000	0.3	485

TABELA 1. Własności mechaniczne biomateriałów metalowych wykorzystanych w analizie.

TABLE 1. Mechanical properties of metallic biomaterials used in the analysis.



RYS. 1. Fragment stentu z nałożoną siatką elementów skończonych typu SOLID 95.

RYS. 2. Podział stentu urologicznego na segmenty.

go miało na celu zmniejszenie średnicy stentu o zadaną wartość przemieszczenia umożliwiając tym samym wprowadzenie stentu do urządzenia implantacyjnego. Otrzyma-
ne wyniki obliczeń dla wszystkich analizowanych biomateriałów i założonych przemieszczeń promieniowych (3, 4 i 5 mm) oraz wydłużenie stentu podczas zaciskania przedstawiono w TABELI 2.

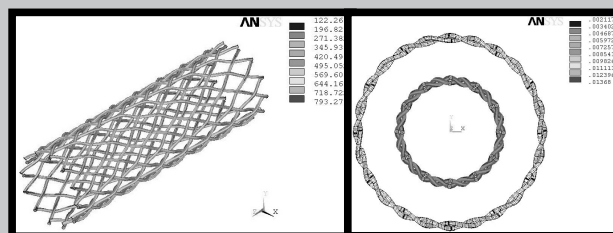
Biomaterial Biomaterial	Założ one przemieszczenie promieniowe Assumed radial displacements mm	Napręż enia zredukowane Reduced stresses MPa	Odształcenia zredukowane Reduced strains %	Długość przed zaciśnięciem Length before clamping mm	Długość po zaciśnięciu Length after clamping, mm
Nitinol (SE 508 Wire)	3	122 ÷ 793	0.2 ÷ 1.3	21	25.5
	4	141 ÷ 984	0.2 ÷ 1.6	21	28.9
	5	153 ÷ 1167	0.2 ÷ 2.0	21	31.2
Stal Stainless steel CrNiMo (AISI316L)	3	408 ÷ 2732	0.2 ÷ 1.3	21	25.5
	4	468 ÷ 3385	0.2 ÷ 1.6	21	28.9
	5	515 ÷ 4014	0.2 ÷ 2.0	21	31.2
Stop CoCr Cobalt alloy (L605)	3	512 ÷ 3324	0.2 ÷ 1.3	21	25.5
	4	590 ÷ 4125	0.2 ÷ 1.6	21	28.9
	5	642 ÷ 4889	0.2 ÷ 2.0	21	31.2

TABELA 2. Wyniki analizy numerycznej dla wszystkich analizowanych biomateriałów przy założonych przemieszczeniach promieniowych.

TABLE 2. Results of the numerical analysis for all analyzed biomaterials for the assumed radial displacements

Podsumowanie

Przeprowadzono analizę numeryczną stentu urologicznego z uwzględnieniem uwarunkowań zabiegu endoskopowego i leczenia zwężeń cewki moczowej spowodowanej łagodnym rozrostem prostaty (BPH) lub zwężeniami cewki moczowej powstałymi w wyniku przebytych chorób lub wypadków. Zabieg implantacji związany był z początkowym zaciśnięciem stentu w urządzeniu implantacyjnym. Zaciśnięcie nie powinno spowodować trwałego odkształcenia materiału stentu tj. nie powinna zostać przekroczona granica plastyczności biomateriału. Wyznaczone wartości naprężeń i odkształceń elementów stentu cewkowego stanowiło podstawę do optymalizacji cech geometrycznych i własności mechanicznych tworzywa metalicznego stosowanego do wyrobu stentów. W dalszych analizach prowadzona będzie symulacja współpracy samorozprężalnego stentu urologicznego z cewką moczową.



RYS. 3. Stan naprężeń zredukowanych dla modelu wykonanego z nitinolu, MPa.

FIG. 3. Reduced stresses in the nitinol model, MPa.

RYS. 4. Stan odkształceń zredukowanych dla modelu wykonanego z nitinolu, x100%.

FIG. 4. Reduced strains in the nitinol model, x100%.

24 wires of the diameter $d=0.3$ mm. The analyses were carried out for 3 different biomaterials - TABLE 1. The analyzed urological stents were meshed with the use of the SOLID 95 finite element - FIG.1. Model was divided into 3 parts. However, only the central part was analyzed - FIG.2.

Results

FIGs.3 and 4 present an example of reduced stresses and strains in the urological stent for the assumed radial displacement equal to 3 mm. The aim of the radial displacement assumption was the decrease of the stent' diameter what allowed to introduce the stent into an implantation device. Obtained results for all analyzed biomaterials and assumed radial displacements (3, 4 and 5 mm) as well as the elongation of the stent were presented in TABLE 2.

Summary

The numerical analysis of the urological stent was carried out. The analysis took into consideration the conditions of endoscopic operation as well as treatment of the constricted urethra caused by a benign prostatic hypertrophy (BPH) or diseases or accidents. The implantation procedure was followed by the initial clamping of the stent in the implantation device. The clamping should not cause a plastic strain, ie. the yield point of the biomaterial should not be exceeded. The obtained stresses and strains were the basis for the optimization of geometrical features and mechanical properties of the metallic biomaterial designed for stents. The further work will concern a mating of a self-expanding stent with a urethra.

Piśmiennictwo

- [1] Lam J.S., Volpe M.A., Kaplan S.A.: Use of Prostatic Stents for the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia in High-risk Patients.
- [2] Fabian K.M.: Per intraprostatiche "Partielle Katheter" (Urologische spirale). Urologe 1980, 19, s.236.
- [3] Barbalias G.A., Siablis D., Liatsikos E.N., Karnabadi D., Yarmenitis S., Bouropoulos K., Dimopoulos J.: Matal stents a new treatment of malignant urateral obstruction. J.Urol. 1997, 158(1), s.54-58.
- [4] Pauer W., Eeckerstorfer G.M.: Use of self-expanding permanent endoluminal stents for benign ureteral strictures: mind-term results. J.Uro. 1999, 162(2), s.319-322.
- [5] Lovquist A., Emanuelsson H., et al.: Pathophysiological mechanisms following coronary angioplasty possible preventive alternatives. J. Inr. Med. 1993, s.213, 233.
- [6] Fishman D.L., Leon M.B. et al.: A randomized comparison of coronary- stent placement and ballon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. N. Engl. J. Med. 1994 s.331, 496-501

References

- [7] Palmaz J.C.: Intracascular stents: Tissue-stent Interactions and Design Considerations. Am J. Radiol. 1993, s.160, 613.
- [8] Agrawal C.C., Haas K.F. et al.: Evaluation of poly (L-lactic acid) as a material for intracascular olymeric stent. Biomaterials 1992, 13, s.176-182.
- [9] Lam J.S., Volpe M.A., Kaplan S.A.: Use of Prostatic Stents for the Treatment of Being Prostatic Hyperplasia in High-risk Patients, Current Science, Inc. 2001, 2:277-284.
- [10] Materiały informacyjne firmy American Medical Systems
- [11] Materiały informacyjne firmy Nitinol Devices and Components.
- [12] Norma PN-ISO 5832-1 Wszczyepy dla chirurgii. Materiały metalowe. Stal nierdzewna do przeróbki plastycznej.
- [13] Standard ISO 5832-5 Implants for surgery. Metallic materials. Wrought cobalt-chromium-tungsten-nickel alloy.

KOPOLIMERY GLIKOLIDU Z TMC, METODA WYZNACZANIA MIKROSTRUKTURY ŁAŃCUCHA Z POMOCĄ SPEKTROSKOPII NMR

JANUSZ KASPERCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI, MACIEJ BERO

CENTRUM CHEMII POLIMERÓW PAN W ZABRZU

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),143-145]

Wstęp

Syntetyczne bioresorbowalne polimery, zwłaszcza alifatyczne poliestry, znalazły z powodzeniem zastosowanie w medycynie jako materiał z którego formuje się degradowalne implanty chirurgiczne, nośniki leków czy podłoża w hodowli komórek. Z pośród tych materiałów, kopolimery glikolidu z trimetylowęglanem (TMC) wydają się bardzo interesujące ze względu na dość duże możliwości modyfikacji ich właściwości, zwiększania elastyczności i zmian profilu degradacji, poprzez zmiany zawartości ugrupowań węglanowych. Pierwszym kopolimerem tego rodzaju, który znalazł zastosowanie jako materiał do tworzenia elastycznych nici chirurgicznych jest materiał znany pod handlową nazwą Maxon[®]. Podczas gdy wiele patentów opisuje sposób otrzymywanie kopolimerów TMC z glikolidem, wciąż brakuje szczegółowej charakterystyki procesu ich syntezy, a także właściwości i mikrostruktury łańcucha. W naszej pracy wykonaliśmy dokładną analizę mikrostruktury kopolimerów glikolidu z TMC i DMC, używając zarówno spektroskopii H-1 jak i C-13 NMR. Poprzez określenie pochodzenia niektórych sygnałów, udało nam się wyprowadzić równania, które okazały się bardzo pomocne przy określaniu mikrostruktury łańcucha kopolimeru, jak również procesów ją kształtujących

Analiza NMR kopolimerów glikolidu z TMC

Analizę mikrostruktury kopolimerów glikolidu z węglanami przeprowadzono porównując próbki otrzymanych kopo-

GLICOLIDE/TRIMETHYLENE CARBONATE(TMC) COPOLYMERS, CHAIN MICROSTRUCTURE ANALYSIS BY HIGH RESOLUTION NMR SPECTROSCOPY

JANUSZ KASPERCZYK, PIOTR DOBRZYŃSKI, MACIEJ BERO

CENTRE OF POLYMER CHEMISTRY, POLISH ACADEMY OF SCIENCES

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),143-145]

Introduction

The synthetic bioresorbable polymers, mainly aliphatic polyesters, with success have been used in medicine as materials to formation of biodegradable surgical implants, drug delivery systems and scaffolds. Among such polyesters, glycolide copolymers with trimethylene carbonate (TMC) are very promising on the basis of high possibility to the physical properties modification such as the increase of flexibility or the degradation profile changes. This modification may be performed by changes of the carbonate units contents in copolymer chain.

The first copolymer of glycolide with TMC, which has been found a commercial application in medicine as surgical sutures, was Maxon[®]. Many patents describe obtainment methods of glycolide/TMC copolymers, but still disadvantage of detailed characterization of synthesis process and properties of obtained polymers and lack of particular chain microstructure analysis.

In this work, the detailed analysis of the chain microstructure in glycolide/TMC copolymers was performed on the basis of H-1 and C-13 NMR spectra. The equations to calculation coefficients and parameters necessary to normal characterization of the copolymer chain structure were formulated such as average lengths of blocks, randomization and transesterification coefficient.

limerów zawierających różne udziały jednostek komonomerycznych glikolidylowych GG do węglanowych w łańcuchach kopolimerów: 15/85 ; 30/70; 50/50; 70/30 [mol %] oraz posiadających różną mikrostrukturę łańcuchów; semiblokową, statystyczną i częściowo ztransestryfikowaną. Zmiana udziałów jednostek komonomerycznych pozwoliła również na śledzenie zmian intensywności linii rezonansowych wraz ze zmianą składu komonomerycznego łańcuchów kopolimeru. W widmie H-1 NMR kopolimeru glikolidu z TMC można zaobserwować szereg linii odpowiadającym odpowiednim sekwencjom komonomerycznym: (zakres grupy metylenowej jednostki glikolidylowej - RYS.1). Dokonane odpowiednie przyporządkowania sygnałów przedstawia TABELA 1. Z kolei na RYS.2 przedstawiono sygnały zaobserwowane w widmie ^{13}C NMR, zakresu grup karbonylowych, ich przyporządkowanie przedstawia TABELA 2. Wyznaczono parametry opisujące budowę łańcuchów kopolimerów; średnie długości bloków, współczynnik transestryfikacji i randomizacji. Z widma H-1 NMR dokładnie można wyznaczyć średnią długość bloków jednostek glikolidylowych (I_i oznaczają intensywności linii rezonansowych poszczególnych sekwencji komonomerycznych zgodnie z TABELĄ 1)

$$I_{e(GG)} = \frac{1}{2} \frac{\sum_{i=1}^8 I_i}{I_7 + I_8 + I_2 + I_3}$$

a średnią długość jednostek węglanowych można obliczyć wykorzystując równanie:

$$I_{e(GG)} \frac{1 - F_{GG}}{F_{GG}}$$

gdzie F_{GG} jest udziałem jednostek glikolidylowych w łańcuchu kopolimerowym, który również wyznaczamy z widma H-1 NMR.

Z widma C-13 NMR można wyznaczyć zarówno średnią długość jednostek glikolidylowych jak i trimetylenowęglanowych z następujących równań (I_i oznaczają intensywności linii rezonansowych poszczególnych sekwencji komonomerycznych zgodnie z TABELI 2):

$$I_{e(GG)} = \frac{1}{2} \frac{\sum_{i=1}^7 I_i}{I_1 + I_2}$$

$$I_{e(T)} = \frac{\sum_{i=8}^{10} I_i}{I_9 + I_{10}}$$

Współczynnik transestryfikacji II rzędu można wyznaczyć analogicznie jak miało to miejsce w przypadku kopolimerów laktydu z kaprolaktonem [1] czy glikolidu z kaprolaktonem [2-4] z równania:

$$T_{II} = \frac{[TGT]}{[TGT]_R}$$

gdzie udział sekwencji TGT w całkowicie zrandomizowanym łańcuchu obliczamy z równania

$$[TGT]_R = \frac{k^2}{(k+1)^3}$$

NMR analysis of glycolide/TMC copolymers

The microstructure analysis of glycolide/carbonate copolymers was performed by comparison of the copolymers obtained with various ratio of comonomeric units (glycolidyl to carbonate) in copolymer chain: 15/85 ; 30/70; 50/50; 70/30 [mol %]. The microstructure analysis was facilitated by synthesis of copolymers with various chain microstructure: semi-block, random and partly transesterified. The changes of the comonomeric units contents in copolymer chain permit for tracking of the resonance intensity lines variation during the changes of comonomeric sequence distribution in copolymer chain.

To the analysis of chain microstructure of analyzed copolymers H-1 and C-13 NMR spectra were used. The methylene protons region (Figure 1) of glycolidyl units in the H-1 NMR spectra of glycolide/carbonate copolymers turned sensitive on chain microstructure. All lines in this range were ordered to appropriate comonomeric sequences (TABLE 1). Moreover, carbonyl region both glycolidyl and carbonate carbons in C-13 NMR spectra (FIG.2) displayed most sensitive for the changes in chain microstructure of such copolymers. Ordering of the observed spectral lines to appropriate comonomeric sequences was shown in TABLE 2.

The parameters describing copolymer chain structure; average lengths of glycolidyl and carbonate blocks, transesterification coefficients and randomization were formulated.

From H-1 NMR spectrum, detailed information about average lengths of glycolidyl blocks may receive (I_i indicates intensities of resonance lines of respective co-monomeric sequences according to TABLE 1).

$$I_{e(GG)} = \frac{1}{2} \frac{\sum_{i=1}^8 I_i}{I_7 + I_8 + I_2 + I_3}$$

Average length of carbonate blocks can be calculated from equation:

$$I_{e(GG)} \frac{1 - F_{GG}}{F_{GG}}$$

where F_{GG} indicates contents of glycolidyl units in copolymer chain calculated from H-1 NMR spectrum.

From C-13 NMR average lengths of glycolidyl and carbonate blocks can be calculated on the basis of below equations (I_i indicates resonance lines intensities of individual comonomeric sequences according to TABLE 2)

$$I_{e(GG)} = \frac{1}{2} \frac{\sum_{i=1}^7 I_i}{I_1 + I_2}$$

$$I_{e(T)} = \frac{\sum_{i=8}^{10} I_i}{I_9 + I_{10}}$$

The second mode of transesterification coefficient may be calculated using the same method which was described for lactide /caprolactone copolyesters [1] or for glycolide/caprolactone copolyesters [2-4]

$$T_{II} = \frac{[TGT]}{[TGT]_R}$$

where TGT sequence contents in the completely random chain may be calculated from equation:

$$[TGT]_R = \frac{k^2}{(k+1)^3}$$

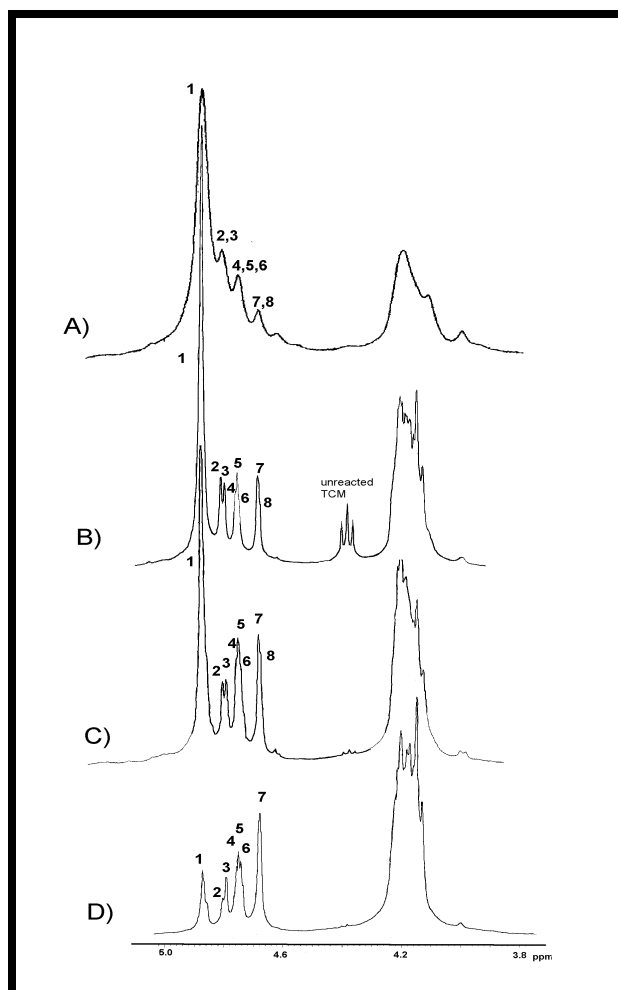


FIG.1. ^1H NMR spectra of TMC/glycolide copolymers (glycolidyl protons range) obtained with use of $\text{Zr}(\text{acac})_4$ as initiator; glycolidyl contains ca. A) 70%mol.; C) 50%mol.; D) 30%mol and obtained with $\text{Fe}(\text{acac})_3$ B) 50%mol.

Line no	Comonomeric sequences	$\delta[\text{ppm}]$
1	GGGGG + GGGGT + TGGGG + TGGGT	4.88
2	GGGGT	4.81
3	TGGGT	4.80
4	TGGGG	4.76
5	TGGGT	4.75
6	TGGT	4.74
7	TGT	4.69
8	TGGT	4.68

TABELA 1.
TABLE 1.

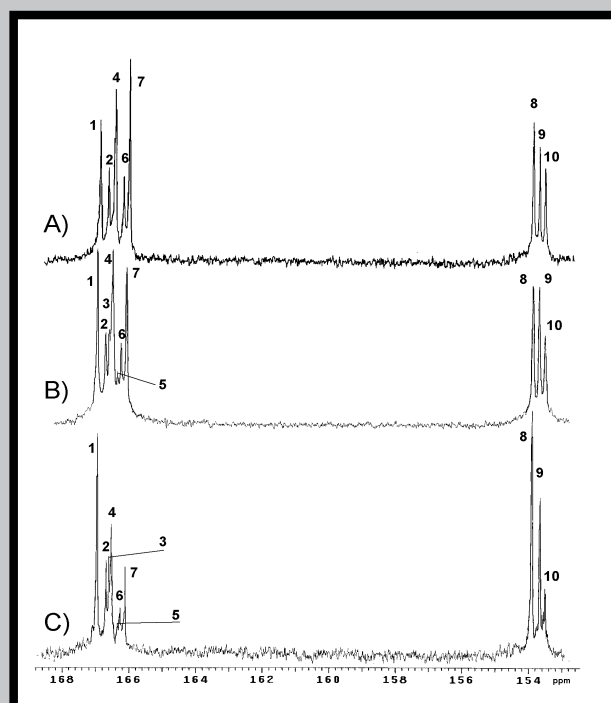


FIG. 2. ^{13}C NMR spectra of glycolide/TMC copolymers (carbonyl carbon range) obtained: A) using $\text{Fe}(\text{acac})_3$ as initiator; contents of glycolidyl units ca. 50%mol.; using $\text{Zr}(\text{acac})_4$ as initiator contents of glycolidyl units ca. B) 50%mol.; C) 30%mol.

Line no	Comonomeric sequences	$\delta[\text{ppm}]$
Glycolidyl carbonyl carbon range		
1	TGGT + GGGGT + TGGGT	167,61
2	TGT	167,36
3	TGGT	167,26
4	TGGGG + GGGGT + TGGGT	167,15
5	TGGGT	167,01
6	TGGGG	166,90
7	GGGGG	166,73
Carbonate carbonyl carbon range		
8	TT = TT T + GGTT + TGTT	154,39
9	TGG = TTGG + GGTGG + TGTGG	154,20
10	TGT = TTGT + GGTGT + TGTGT	154,03

TABELA 2.
TABLE 2.

Piśmiennictwo

References

- [1] J. Kasperczyk, M. Bero, Makromol. Chem. 1991, 192, 1777.
- [2] J. Kasperczyk, Macromol. Chem. Phys., 1999, 200, 903.
- [3] P. Dobrzyński, J. Polym. Sci. Part A., 2002, 40, 1379.
- [4] P. Dobrzyński, S. Li, J. Kasperczyk, M. Bero, F. Gasc, M. Vert, Biomacromolecules, 2005, 483.

CHARAKTERYSTYKA WARSTWY WIERZCHNIEJ STOPU Ti6Al4V PO ODKSZTAŁCENIU PRZEZ GIĘCIE

AGNIESZKA KIERKOWSKA, ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK,
MARIUSZ JENEK

UNIwersytet Zielonogórski, ul. Podgórna 50, 65-246
Zielona Góra

[*Inżynieria Biomateriałów*, 47-53, (2005), 146-148]

Wstęp

Elementom implantowym w czasie użytkowania stawiane są dwa podstawowe wymagania: biotolerancja oraz dobre własności mechaniczne, które szczególnie zależą od stanu stereometrycznego anodowej warstwy wierzchniej narażonej na oddziaływanie środowiska korozyjnego, zewnętrznych obciążeń oraz na śródoperacyjne i pooperacyjne uszkodzenia. Wygładzenie powierzchni poprzez zmniejszenie wysokości i ilości nierówności zmniejsza czynną powierzchnię korodującą, zwiększając tym samym odporność na korozję. Odporność korozyjna z kolei [1] decyduje o podatności implantu na oddziaływanie środowiska płynów i tkanek, a co za tym idzie o biotolerancji. Według [2,3], im mniejsze ubytki korozyjne oraz wyższy potencjał anodowy, tym większa biotolerancja metalu lub stopu w organizmie. Na eksploatacyjne własności wytrzymałościowe według [4] największy wpływ mają: ośrodek korozyjny oraz chropowatość powierzchni. Przez zmniejszenie chropowatości, np. Ra z 2,5 do 0,16 μm można uzyskać poprawę wytrzymałości zmęczeniowej o 25÷100%. Niewielu autorów [5,6,7] analizowało również skutki mechanicznej deformacji na zachowanie anodowych warstw pasywnych stopów tytanu w roztworze fizjologicznym.

W pracy przedstawiono zmiany zachodzące na powierzchni próbek wykonanych z implantowego stopu Ti6Al4V po odkształceniu plastycznym przez gięcie. Zmiany te odpowiadają odkształceniom zachodzącym w warstwach powierzchniowych podczas implantacji (stan śródoperacyjny). Warstwę wierzchnią charakteryzowano na podstawie parametrów chropowatości oraz przebiegu krzywych Bode'a (elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna EIS). Dodatkowo wyznaczano potencjały korozyjne Ekor w celu określenia wpływu gięcia na odporność korozyjną w roztworze fizjologicznym Ringera.

Badania

W badaniach zastosowano próbki wykonane z implantowego stopu Ti6Al4V o średnicy 6mm i długości 40mm. Próbkę polerowano mechanicznie, a następnie anodowano w 0,5 M roztworze H3PO4 (wg patentu 185176). Gięcie (o kąty 10°, 20°, 30° i 20°×2) wykonano wg PN-EN ISO 7438-2002 z zachowaniem analogii do sposobu śródoperacyjnego kształtowania prętów. Część próbek pozostawiono w stanie nieodkształconym oraz bez anodowania. Pomiary chropowatości 2D i 3D oraz pomiary elektrochemiczne wykonano przy użyciu odpowiednio: profilografometru PGM-1C oraz zestawu ATLAS 9831 z platynową elektrodą pomocniczą i nasyconą elektrodą kalomelową (NEK) jako elektrodą odniesienia. W przypadku próbek giętych, pomiary dokonywano w strefach max. rozciąganych o powierzchnię 0,3cm². Stan stereometryczny oceniano na podstawie wybranych parametrów chropowatości wg PN-EN ISO 4287:

CHARACTERISTIC SURFACE LAYER OF Ti6Al4V ALLOY AFTER DEFORMATION BY BENDING

AGNIESZKA KIERKOWSKA, ELŻBIETA KRASICKA-CYDZIK,
MARIUSZ JENEK

UNIwersytet Zielonogórski, ul. Podgórna 50, 65-246
Zielona Góra

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53, (2005), 146-148]

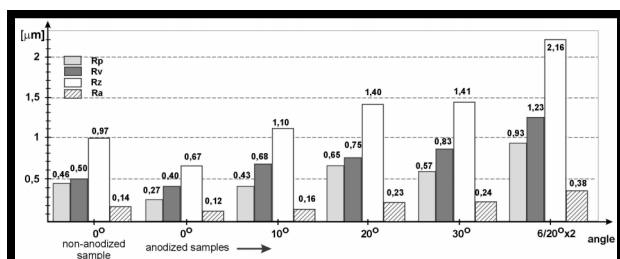
Introduction

The basic requirements for implant materials include the biotolerance and proper mechanical properties, which are particularly dependent on external loads and the stereometry of anodic surface layer. The latter results from the quality of procedures applied during the intra-and/or post-surgery treatments. To some extent the surface finishing treatment reduces an active corrosion enhancing the corrosion resistance by the decrease of the number of irregularities on the surface. Nevertheless, the corrosion resistance of biomaterials [1] is the crucial factor of their susceptibility to the interaction between tissues and organism fluids. According to [2,3] the less severe corrosion and the higher anodic potential, the better biotolerance of metals and alloys in a living organism is observed. The corrosive environment and the roughness of surface have the greatest impact on strength properties [4]. The decrease of roughness, for example the Ra value from 2,5 to 0,16 μm can improve fatigue strength by 25÷100%. Only a few workers [5,6,7] attempted to analyze the effects of a mechanical deformation on the behaviour of anodic passive films on titanium alloys in Ringer's solution.

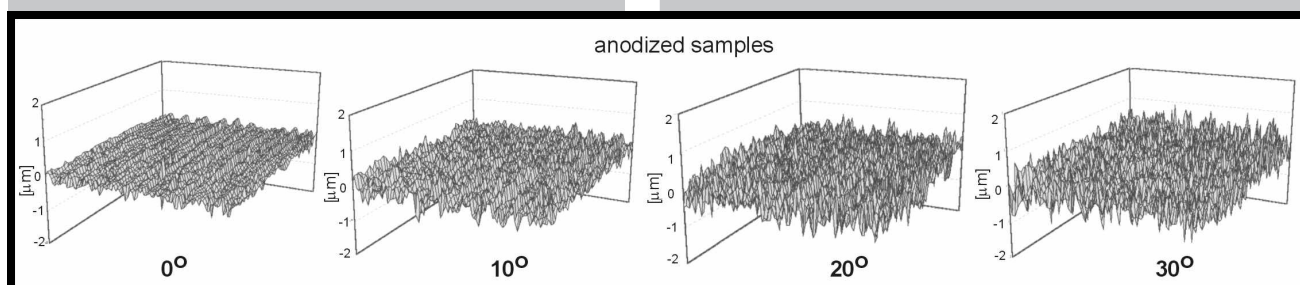
In this paper, changes of anodic surface layer on the Ti6Al4V specimens caused by plastic deformation through bending are presented. These changes correspond to deformations which occur during of implantation. Surface layers were characterized by roughness parameters, electrochemical impedance spectroscopy EIS (Bode diagrams). Additionally, the corrosion potential values Ecor were determined in order to determine the effect of bending on the corrosion resistance of titanium alloy in Ringer's solution (simulated body fluid SBF).

Experimental

The Ti6Al4V alloy specimens of 6mm diameter, 40mm long were used. Specimens were mechanically polished and anodized in 0.5 M H3PO4 solution (according to the patent PL 185176). Bending (at angles of 10°, 20°, 30° and twice 20°) was performed according to PN-EN ISO 7438-2000 in analogy to surgical procedures applied during shaping of implant rods during intra-surgery treatments. Some samples were non-anodized and non-deformed for comparison. Measurements of roughness 2D, 3D parameters and the electrochemical measurements (EIS, Ecor) were carried out with: the profilograph PGM-1C and the electrochemical interface ATLAS 9831, respectively. Platinum plate as the counter-electrode and the saturated calomel electrode (SCE) as the reference electrode were used. Only an area of 0.3cm² in the max. tensile stress zone of the bent samples were exposed to the electrolyte. The stereometry of surface layer was evaluated by some roughness parameters: Rp, Rv, Rz, Ra, according to PN-EN ISO 4287.



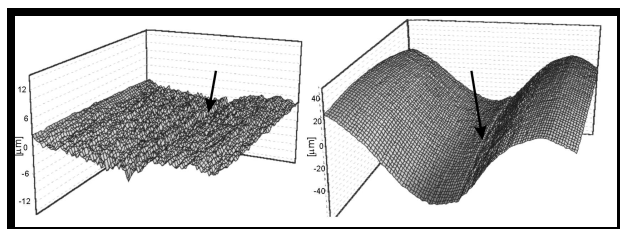
RYS. 1. Parametry chropowatości dla próbek anodowanych i bez anodowania, po gięciu i bez odkształceń, wykonanych ze stopu Ti6Al4V.
FIG. 1. Roughness parameters for anodized and non-anodized, bending and not deformation samples of Ti6Al4V alloy.



Rp, Rv, Rz, Ra. Pomiary EIS przy częstotliwości w zakresie od 105 Hz do 0,18 Hz oraz pomiary E_{kor} wykonano niezwłocznie po zanurzeniu w roztworze fizjologicznym Ringera (pH 7,2; temp. 36,6°C).

Wyniki

Anodowanie wyraźnie wpływa na wygładzenie warstwy wierzchniej (RYS.1). W porównaniu do próbki nie anodowanej największy spadek wartości parametrów chropowatości zanotowano dla Rp, co świadczy o rozpuszczaniu wierzchołków nierówności podczas tego procesu. Zwiększenie kąta gięcia powoduje zwiększenie chropowatości powierzchni w miejscu odkształcenia (RYS.2). Dużemu wzrostowi wartości Rz i Rv dla próbek giętych dwukrotnie (2x20°) towarzyszy wystąpienie mikropęknięć, co zaobserwowano na skaningu 3D o długości 4mm (RYS.3). Charakterystyki EIS w postaci diagramów Bode'a (RYS.4) również wskazują na zmiany zachodzące w anodowej warstwie wierzchniej wskutek gięcia. Krzywe Bode'a dla próbek anodowanych i nie odkształconych charakteryzują się dwiema stałymi czasowymi (dwupoziomowa struktura warstwy) (RYS.4). Kolejne krzywe Bode'a najpierw stopniowo (dla próbek giętych pod mniejszymi kątami: 10° i 20°), a następnie wyraźnie (dla próbek giętych pod większymi kątami 30° oraz przeginanych 20°x2) przechodzą w krzywe o jednej stałej cza-



RYS. 3. Skan 3D próbki giętej 20°x2 z mikropęknięciem na powierzchni.
FIG. 3. Scan 3D for sample bending 20°x2 with microcrack of the surface.

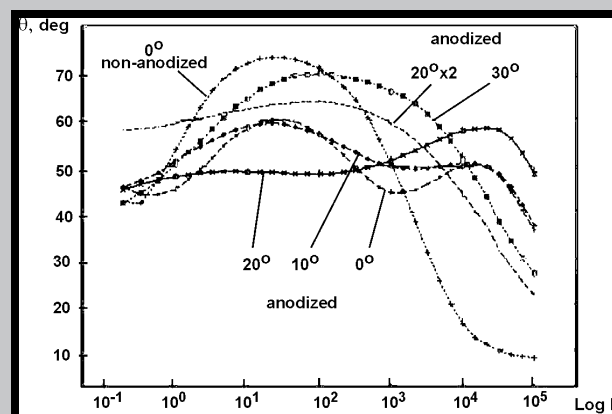
Electrochemical impedance measurements (EIS) at the frequency 105 to 0,18 Hz and the corrosion potential E_{cor} measurements were performed immediately after immersion in Ringer's solution (pH 7.2 and 36.6°C).

Results

Anodizing significantly smoothes the surface of material (FIG.1). The biggest decrease of Rp observed after anodizing confirms that the irregularities of the surface had been dissolved. The increase of bending angle causes the increase of roughness at the deformation site (FIG.2). The high increase of Rz and Rv values in case of doubly bent specimen 20°x2 was accompanied by microcracks shown on 3D scan (FIG.3). Bode diagrams also indicate changes due to bending (FIG.4). Two time constant Bode diagrams

RYS. 2. Skany 3D warstwy wierzchniej na tytanie przed i po odkształceniu przez gięcie.
FIG. 2. Scanning 3D surface layer on Ti6Al4V before and after bending.

(two-layered anodic films) for non-deformed samples gradually change into the one time constant curves for the samples bent at bigger angles (30°) and samples doubly bent (20°x2), which is also characteristic for non-anodized samples. Such Bode spectra are the evidence of transformation of two layered structure of surface film (thin porous layer over the barrier oxide layer) into the porous layer with pores reaching down to the surface of material. The lower values of corrosion potential as the bending angle increases (for angle 0°, 10°, 20°, 20°x2, 30°, values E_{cor} : +492mV, 480mV, 467mV, 436mV, 388mV (SCE), respectively), confirm worse protective properties of the surface alloy due to bending.



RYS. 4. Diagramy Bode'a $-\Theta=f(\log F)$ dla próbek ze stopu Ti6Al4V: anodowanych i bez anodowania, odkształconych i bez odkształceń przez gięcie.
FIG. 4. Bode diagrams $-\Theta=f(\log F)$ for samples of Ti6Al4V alloy: anodized and non-anodized, deformed and non-deformed by bending.

sowej (jak dla próbki bez warstwy anodowej), co potwierdza przerwanie warstwy tlenkowej i jej porowaty charakter na całej grubości warstwy do podłoża materiału w rejonie odkształcenia. Pogorszenie odporności korozyjnej w wyniku naruszenia spójności anodowej warstwy wierzchniej przejawia się też spadkiem potencjału korozyjnego E_{kor} w miarę wzrostu odkształcenia (dla kątów 0°, 10°, 20°, 20°x2, 30°, odpowiednio E_{kor} +492mV, 480mV, 467mV, 436mV, 388mV). Próbki nie anodowane i nie odkształcone przyjmowały ujemne wartości $E_{kor} \approx -20$ mV (NEK).

Wnioski

Rezultaty badań dowodzą, że śródoperacyjne kształtowanie elementów prętowych wykonanych ze stopu Ti6Al4V wpływa na znaczny wzrost parametrów chropowatości oraz zmianę charakterystyki nierówności, a w przypadku gięcia dwukrotnego (przebiegania) na pojawienie się mikropęknięć, które mogą niekorzystnie wpływać na bezpieczną eksploatację pooperacyjną. Ze wzrostem kąta gięcia zmienia się również charakterystyka warstwy. Miejsce struktury dwupoziomowej (szczelna warstwa anodowa pokryta na powierzchni warstwą porowatą) zajmuje jednopoziomowa warstwa porowata z porami (mikropęknięciami) sięgającymi podłoża (wyniki EIS). Pogarsza się odporność korozyjna przejawiająca się spadkiem potencjałów korozyjnych E_{kor} . Stopy tytanu należą do biomateriałów, które podczas przechowywania w środowisku zawierającym tlen (środowisko płynów ustrojowych) potrafią odnawiać uszkodzoną warstwę pasywną. Jak dowodzą badania [7,8] powierzchnie gięte posiadają również duże powinowactwo do pokrywania się składnikami roztworu - hydroksyapatytem. Nie wyjaśniona jednak pozostaje kwestia wpływu eksploatacyjnych obciążeń wynikających z czynności życiowych pacjentów, które często mają charakter zmęczenia na przebieg procesów "naprawiania" uszkodzonej śródoperacyjnie ochronnej warstwy anodowej.

Non-anodized and non-deformed samples are characterized by much lower corrosion potential values $E_{cor} \approx -20$ mV (SCE).

Conclusions

Shaping of implant rods made with the Ti6Al4V alloy during the intra-surgical treatment induces significant increase of roughness parameters. Characteristic two layered structure of the anodic films at bending angles bigger than 30° (and for samples doubly bent) change into the porous structure with pores reaching the surface of the substrate materials and microcracks of the anodic film. The decrease of corrosion potentials values also confirms worse protective properties of deformed surface layers. Titanium alloys are susceptible to passive layer regeneration in media, which contain oxygen (physiological solutions). Studies [7,8] give an evidence that deformed surface layers show higher susceptibility of being coated by solution components - hydroxyapatite. However, the question of the influence of external loads (freeing corrosion) on the "self-repairing" processes of anodic layers on titanium alloys is still open and studies on this issue in progress.

Piśmiennictwo

References

- [1] J. Marciniak: Inżynieria biomateriałów, 1(1997), ss.13-19.
- [2] J. Marciniak, Z. Paszenda: Spondyloimpl. zaawansowanego leczenia kręgosłupa. Z. Góra 2005; ss.133-142.
- [3] Clarke E.G.C., Hickman J. J. Bone. Jt. Surg. 35-A (1953); pp. 467-471.
- [4] T. Burakowski, T. Wierzchoń: Inżynieria powierzchni. Warszawa 1995.
- [5] J. Marciniak, W. Chrzanowski, J. Żak, Inżynieria Biomateriałów, 30-33 (2003); ss. 56-58.
- [6] J.R. Goldberg, J.L. Gilbert, Biomaterials, 25 (2004); pp. 851-864.
- [7] E. Krasicka-Cydzik, A. Kierzkowska. Inżynieria biomateriałów. 37 (2004); ss.53-56.
- [8] E. Krasicka-Cydzik, I. Głazowska, M. Michalski. Inżynieria Biomateriałów 38-42 (2004); ss.57-59.

WPŁYW DZIAŁANIA PLAZMY H_2O_2 NA WŁAŚCIWOŚCI FILMÓW POLISULFONOWYCH

J.KOWAL*, B.CZAJKOWSKA**, S. MURATÓW-BODUCH*, A.ORGANISIAK*, B.TRYBALSKA***

*WYDZIAŁ CHEMII, UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, KRAKÓW,

**COLLEGIUM MEDIUM, UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, KRAKÓW,

***WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, AGH, KRAKÓW

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),148-151]

Wprowadzenie

Polisulfon należy do materiałów stosowanych do produkcji membran filtracyjnych (np. do hemodializy [1]) oraz różnego rodzaju implantów medycznych [2]. W prezentowanej pracy dokonano próby modyfikacji powierzchni polisulfonu w wyniku działania plazmy H_2O_2 . Badano zmiany powierzchni polimeru oraz oddziaływania fibroblastów i osteoblastów z polimerem oryginalnym i modyfikowanym. Zwrócono szczególną uwagę na proces adhezji bakterii Staphylococ-

THE EFFECT OF PLASMA H_2O_2 TREATMENT ON THE PROPERTIES OF POLYSULFONE FILMS

J.KOWAL*, B.CZAJKOWSKA**, S. MURATÓW-BODUCH*, A.ORGANISIAK*, B.TRYBALSKA***

*FACULTY OF CHEMISTRY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, KRAKÓW

**COLLEGIUM MEDICUM, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, KRAKÓW

***FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND TECHNOLOGY, AGH-UST, KRAKÓW

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),148-151]

Introduction

Polysulfone is frequently used as a material for filtration membranes (eg., for haemodialysis [1]) and medical implants of various types [2]. In this paper we tried to modify the surface of polysulfone films by means of the plasma H_2O_2 treatment. The changes of the polymer surfaces were

cus epidermidis, które, ze względu na zdolność do tworzenia biofilmów, są jedną z ważniejszych przyczyn zakażeń szpitalnych [3].

Materialy i metody

Polysulfon (PSU) (Aldrich, Mn=16 000); ludzkie linie komórkowe ATCC (American Type Culture Collection): osteoblasts: hFOB 1.19, (2×10^4 komórek/cm³), fibroblasts: HS-5, (2×10^4 komórek/cm³), hodowane w inkubatorze w atmosferze powietrza (95%) i CO₂ (5%) w 37°C (fibroblasty) i 34°C (osteoblasty); Staphylococcus epidermidis: szczepy 35547 i 12228, (1.5×10^8 cfu/ml), hodowane w Tryptic Soy Broth (DIFCO).

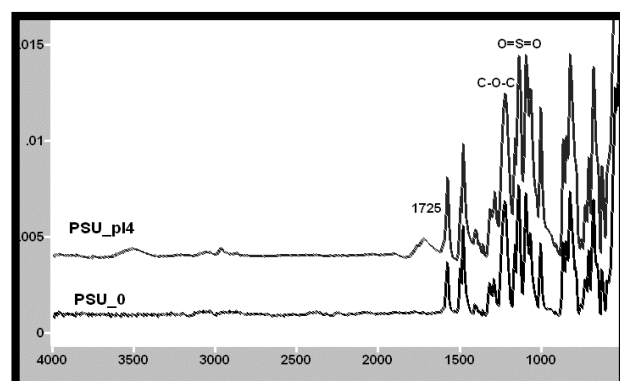
Oryginalne filmy polisulfonowe (oznaczane jako PSU_0) poddano działaniu plazmy H₂O₂ w układzie Sterrad 100 (13,56 MHz, ciśnienie: 0.07-2.0 kPa, temperatura 57°C) (1-4 cykle, próbki oznaczane jako PSU_pl1 - PSU_pl4). Widma próbek polimerowych rejestrowano przy pomocy spektrofotometrów: 8452A Hewlett Packard (UV-VIS), EQIUNOX 55, Bruker (FTIR), DIGILAB FTS 60 (ATR). Obserwacje SEM prowadzono stosując przyrząd JSM-5400 Jeol (5kV i 10 kV). Kąty zwilżania wodą badanych filmów mierzono techniką leżącej kropli przy pomocy Surftens Universal (OEG GmbH Germany). Żywotność komórek określono metodą MTS, a stężenie kolagenu typu I wyznaczono metodą ELISA (DSLabs Inc., USA).

Wyniki i dyskusja

Analiza spektralna (widma absorpcyjne UV i FTIR, widma IR ATR) potwierdziły zachodzenie procesu degradacji polisulfonu oraz tworzenia grup karbonylowych i hydroksylowych (RYS.1). Zaobserwowano stopniowe zmniejszanie pasm absorpcyjnych z maksimami przy 272 nm (gupa fenylowa), 1152 cm⁻¹ (grupa sulfonowa), 1245 cm⁻¹ (grupa eterowa). Zmianom tym towarzyszył wzrost absorpcji w zakresie 300-400nm, przypisany tworzeniu sprzężonych układów polifenylowych, odpowiedzialnych za żółknięcie próbek polimeru. Obserwowano także wzrost absorpcji charakterystycznej dla fenolowych grup -OH (~3500 cm⁻¹) i grup karbonylowych (~1725 cm⁻¹).

Kąty zwilżania wodą badanych próbek (RYS.2) uległy znacznemu zmniejszeniu w wyniku działania plazmy (PSU_0: 84°, PSU/pl4: 36°), potwierdzając wzrost hydrofilowości modyfikowanych powierzchni.

W następnym etapie badań przeprowadzono hodowle fibroblastów i osteoblastów w obecności niemodyfikowanych filmów PSU oraz filmów PSU poddanych działaniu plazmy w ciągu jednego lub dwóch cykli. Wyniki oznaczeń żywot-



RYS. 1. Widma IR ATR filmu PSU oryginalnego i modyfikowanego plazmowo.

FIG. 1. IR ATR spectra of original and plasma modified PSU film.

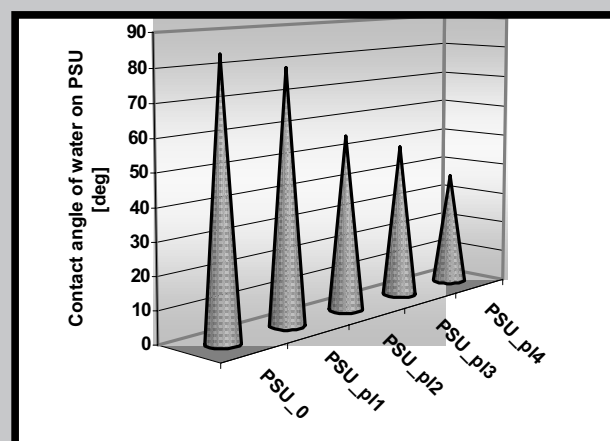
investigated and the interactions of fibroblasts and osteoblasts with polysulfone and modified polysulfone samples were monitored. Attention was paid to the adhesion of Staphylococcus epidermidis, being the important cause of nosocomial infections due to the ability to form biofilms on medical devices [3].

Materials and methods

Polysulfone (PSU) (Aldrich, Mn = 16 000); human cell lines ATCC (American Type Culture Collection): osteoblasts: hFOB 1.19, (2×10^4 cells/cm³), fibroblasts: HS-5, (2×10^4 cells/cm³), cultured in an incubator in the atmosphere of air (95%) and CO₂ (5%) at 37°C (fibroblasts) and 34°C (osteoblasts); Staphylococcus epidermidis: strains 35547 and 12228, (1.5×10^8 cfu/ml), cultured in Tryptic Soy Broth (DIFCO).

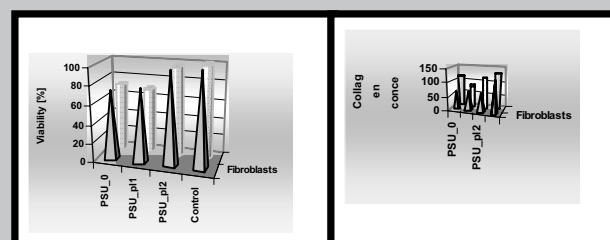
The original films (denoted as PSU_0) were subjected to plasma H₂O₂ treatment in a Sterrad 100 system (13,56 MHz, pressure: 0.07-2.0 kPa, temperature 57°C) (1-4 cycles, samples denoted as PSU_pl1 - PSU_pl4). The spectra of polymer samples were recorded with 8452A Hewlett Packard (UV-VIS), EQIUNOX 55, Bruker (FTIR), DIGILAB FTS 60 (ATR) spectro-photometers. SEM observations were performed with the use of JSM-5400 Jeol instrument (5kV and 10 kV). The sessile drop technique with Surftens Universal OEG GmbH Germany was applied to determine contact angles of water on the investigated films. The viability of the cells was determined using MTS method and the concentration of collagen type I was evaluated by means of ELISA tests (DSLabs Inc., USA).

Results and discussion



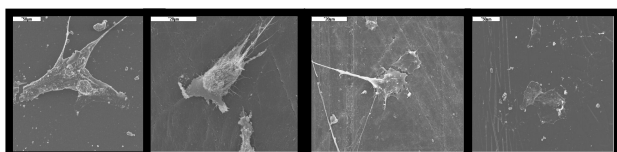
RYS. 2. Kąty zwilżania wodą.

FIG. 2. Contact angles of water.



RYS. 3. Żywotność komórek (a) i wydzielanie kolagenu (b); komórki hodowane w obecności oryginalnych i modyfikowanych plazmowo filmów polisulfonowych.

FIG. 3. The viability of the cells (a) and the secretion of collagen (b); cells cultured in the presence of original polysulfone film and plasma modified ones.



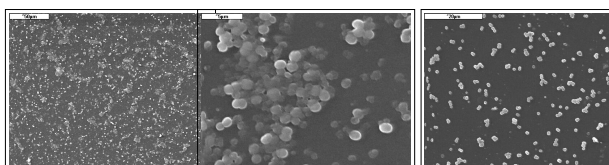
RYS. 4. Fibroblasty na filmach PSU_0 (a) oraz PSU_pl2 (b).

FIG. 4. Fibroblasts on PSU_0 (a) and PSU_pl2 (b) films.

ności komórek, przedstawione na RYS.3a, wskazują, że żywotność fibroblastów i osteoblastów hodowanych z próbkami PSU_pl1 jest porównywalna z żywotnością komórek inkubowanych z filmem PSU_0 oraz, że w wyniku działania plazmy w czasie 2 cykli żywotność wzrasta do wartości zbliżonej dla próby kontrolnej. Stopień aktywacji komórek oceniono poprzez oznaczenie stężenia kolagenu wydzielanego przez fibroblasty i osteoblasty (RYS.3b). Ilości kolagenu produkowanego przez fibroblasty są zbliżone dla filmów niemodyfikowanych oraz modyfikowanych (PSU_0, PSU_pl1 i PSU_pl2), natomiast w przypadku osteoblastów stężenie kolagenu jest obniżone w obecności filmów PSU_pl1; dla PSU_pl2 jest ono porównywalne z wartością uzyskaną dla filmów oryginalnych (PSU_0).

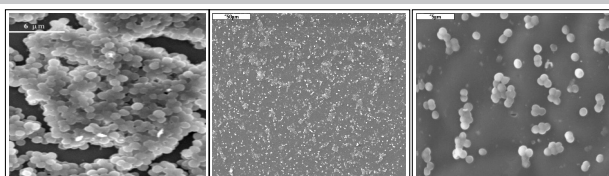
Ocena in vitro adhezji fibroblastów i osteoblastów oraz bakterii *Staphylococcus epidermidis* została dokonana w oparciu o obserwacje SEM. Próbki komórek lub bakterii nałożono na badane filmy polimerowe i inkubowano w temperaturze 37°C w ciągu 24 godzin. Komórki utrwalano aldehydem glutarowym, odwadniano etanolem, suszono (fibroblasty i osteoblasty: w punkcie krytycznym CO₂) i napyłano grafitem. Analiza obrazów SEM (RYS.4 i 5) wskazuje, że fibroblasty i osteoblasty dobrze przylegają do oryginalnych filmów PSU. Rozpłaszczone fibroblasty z wykształconymi filopodiami obserwowano również na filmach PSU poddanych działaniu plazmy. Osteoblasty na filmach modyfikowanych plazmowo przyjmowały kształt bardziej zwarty i kulisty. Obrazy SEM bakterii *Staphylococcus epidermidis* utrwalonych na filmach niemodyfikowanych i modyfikowanych przedstawiono na RYS.6 i 7.

Stwierdzono, że bakterie wykazują tendencję do tworzenia agregatów (*S. epidermidis* 12228) i biofilmów (*S. epidermidis* 35547) na oryginalnych filmach PSU, podczas gdy tego typu skupiska bakteryjne nie występują na powierzchniach modyfikowanych plazmowo.



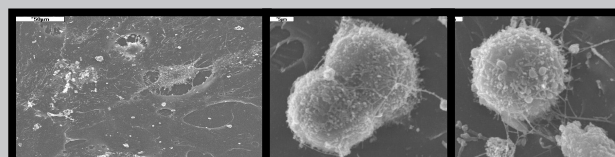
RYS. 6. Staphylococcus epidermidis 12228 na filmach polisulfonowych: (a) PSU_0, (b) PSU_p2.

FIG. 6. Staphylococcus epidermidis 12228 on polysulfone films: (a) PSU_0, (b) PSU_p2.



RYS. 7. Staphylococcus epidermidis 35547 na filmach polisulfonowych: (a) PSU_0, (b) PSU_pl1, (c) PSU_pl2.

FIG. 7. Staphylococcus epidermidis 35547 on polysulfone films: (a) PSU_0, (b) PSU_pl1, (c) PSU_pl2.



RYS. 5. Osteoblasty na filmach PSU_0 (a) and PSU_pl2 (b).

FIG. 5. Osteoblasts on PSU_0 (a) and PSU_pl2 (b) films.

Spectral analysis (UV and FTIR absorption spectra, IR ATR spectra) confirmed the degradation of polysulfone as well as the formation of carbonyl and hydroxyl groups (FIG.1). The gradual diminishing of the absorption bands with maxima at 272 nm (phenyl group), 1152 cm⁻¹ (sulfone group), 1245 cm⁻¹ (ether group) was observed. Those changes were accompanied by the growth of absorption in the range of 300-400nm, attributed to the formation of conjugated polyphenyl structures, responsible for the yellowing of the samples. The increase of the absorption, characteristic for OH - phenol type groups (~3500 cm⁻¹) and carbonyl groups (~1725 cm⁻¹) was also observed.

The contact angles of water on the investigated samples (FIG.2) considerably decreased after plasma treatment (PSU_0: 84o, PSU/pl4: 36o), confirming the increase in the hydrophilic character of the modified surfaces.

Fibroblasts and osteoblasts were then cultured in the presence of unmodified PSU films and the films subjected to 1 or 2 cycles of plasma treatment. The results of the determination of the cell viability, presented in FIG.3a, show that the viability of fibroblasts and osteoblasts cultured with PSU_pl1 samples is comparable to the PSU_0 and the two cycles of plasma treatment leads to the increase of the viability which becomes close to the control. The level of cell's activation was estimated by the determination of the amount of collagen type I secreted by osteoblasts and fibroblasts (FIG.3b). The collagen secretion by fibroblasts for original film and modified PSU_pl1 and PSU_pl2 is similar, while in the case of osteoblasts it is lowered in the presence of PSU_pl1; for PSU_pl2 it is comparable with the value characteristic of PSU_0.

In vitro evaluation of the adhesion of fibroblasts and osteoblasts as well as bacteria *Staphylococcus epidermidis* to the investigated samples was done by means of SEM observation. Samples of cells or bacteria were put on the films and incubated at 37°C for 24 h. Cells were then fixed with glutaraldehyde, dehydrated in ethanol gradient, dried (fibroblasts and osteoblasts: CO₂ critical point) and coated with graphite.

The analysis of SEM data (FIGs.4 and 5) indicates that fibroblasts and osteoblasts are well attached to the original PSU films. The flattened fibroblasts with filopodial extensions are also observed on the plasma treated PSU. By contrast, osteoblasts on plasma modified PSU displayed a more condensed rounded shape.

SEM images of *Staphylococcus epidermidis* fixed on polysulfone original films and plasma treated films are presented in FIGs.6 and 7.

It has been observed that bacteria showed a tendency to form aggregates (*S. epidermidis* 12228) and biofilms (*S. epidermidis* 35547) on original PSU films whereas such forms of bacterial colonies are not observed on plasma treated surfaces.

Conclusions

Taking into account the presented results, one can conclude that the treatment with H₂O₂ plasma changes

Wnioski

Biorąc pod uwagę przedstawione wyniki badań można stwierdzić, iż działanie H_2O_2 zmienia powierzchnię polisulfonu; staje się ona bardziej hydrofilowa dzięki wprowadzeniu grup polarnych (karbonylowe, hydroksylowe). Tego typu modyfikacja prowadzi do znacznego obniżenia kąta zwilżania wodą powierzchni polimeru. Biogodność, oceniona jako żywotność fibroblastów i osteoblastów hodowanych w obecności modyfikowanych filmów, jest zadowalająca; komórki ulegają adhezji na badanych materiałach. Tworzenie biofilmów i agregatów bakteryjnych *Staphylococcus epidermidis* na materiałach poddanych działaniu plazmy jest znacznie zahamowane.

WPŁYW PROMIENIOWANIA UV NA ODDZIAŁYWANIE POWIERZ- CHNI POLISULFONU Z KOMÓRKAMI

B.CZAJKOWSKA*, J.KOWAL**, A.BIAŁECKA***, A.STOBIERSKA*,
M.PTAK*, M.BOBEK*, J.MARCINKIEWICZ**

*KATEDRA IMMUNOLOGII,

UNIwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

**WYDZIAŁ CHEMICZNY UNIwersytetu Jagiellońskiego

***CENTRE OF MICROBIOLOGICAL RESEARCH AND AUTOVACCINES
LTD., CRACOW

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),151-154]

Wstęp

Polisulfon (PSU) jest polimerem o dużym zastosowaniu w medycynie. Produkuje się z niego elementy wszczepiane na stałe do organizmu takie jak: sztuczne naczynia, zastawki czy elementy sztucznego serca i również sprzęt medyczny jak wenflony, cewniki, błony do hemodializy. Powierzchnia PSU jest silnie hydrofobowa, co według niektórych autorów nie sprzyja adhezji komórek, natomiast wzmacnia adsorpcję białek. Nasze wcześniejsze badania wykazały, że naświetlanie powierzchni PSU promieniowaniem UV zmienia charakter powierzchni z hydrofobowej na hydrofilową, co pociąga za sobą odmienne reakcje komórkowe.

Wykonywany z PSU, podobnie jak i z innych materiałów sprzęt medyczny typu cewniki czy wenflony bardzo często jest miejscem powodującym zakażenia.

W ostatnich latach pojawia się wiele doniesień o zakażeniach szpitalnych spowodowanych przez bakterie występujące jako normalna flora bakteryjna człowieka należy do nich np. *Staphylococcus epidermidis* (S.E) zasiedlający skórę i błony śluzowe. S.E, nie wydzielając uszkodzających tkanki toksyn a jego patogenność spowodowana jest wytwarzaniem biofilmu. Zakażenia związane z S.E mają najczęściej charakter chroniczny a spowodowane są kontaktem z ciałem obcym takim jak np. cewnik czy element wszczepu. Pierwszym etapem powstawania biofilmu jest przyleganie bakterii do powierzchni. Następnie formowana jest wielowarstwowa kolonia i wytwarzana zewnątrzkomórkowa

polysulfone surface making it more hydrophilic due to the introduction of polar groups containing oxygen (carbonyl, hydroxyl). This type of the modification results in the diminished contact angles of water on polymer surfaces. The biocompatibility, estimated as the viability of human fibroblasts and osteoblasts cultured in the presence of modified samples, is satisfactory; the cells adhere to the films. The formation of biofilms and aggregates of *Staphylococcus epidermidis* is strongly inhibited on H_2O_2 plasma treated PSU surfaces.

Piśmiennictwo

References

[1] F. Gores, P. Montag, C. Schall, J. Vienken, S. K. Bowry, *Biomaterials* 23 (2002) 3131.

[2] S. Savariar, G. S. Underwood, E. M. Dickinson, P. J. Schielke, A. S. Hay, *Desalination* 144 (2002) 15.

[3] C. Vuong, M. Otto, *Microbes and infections* 4 (2002) 481.

EFFECT OF UV RADIATION ON POLYSULFONE SURFACE - CELL INTERACTION

B.CZAJKOWSKA*, J.KOWAL**, A.BIAŁECKA***, A.STOBIERSKA*,
M.PTAK*, M.BOBEK*, J.MARCINKIEWICZ**

*DEPARTMENT OF IMMUNOLOGY,

COLLEGIUM MEDICUM, JAGIELLONIAN UNIVERSITY

**FACULTY OF CHEMISTRY, JAGIELLONIAN UNIVERSITY

***CENTRE OF MICROBIOLOGICAL RESEARCH AND AUTOVACCINES
LTD., CRACOW

Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),151-154]

Introduction

Polysulfone (PSU) is a polymer of a wide range of applications in medicine. It is used for producing permanent implants such as artificial vessels, cardiac valves or elements of artificial heart as well as medical devices such as catheters, or hemolysis membranes. PSU surface is strongly hydrophobic, which, according to many researchers, contributes to cellular adhesion, while enhancing protein adsorption. Our previous research proved that exposure of PSU surface to UV radiation changes its hydrophobic character into hydrophilic, which results in different reactions of cells.

Medical devices such as catheters or intravascular catheters made from PSU and other materials are often a place where infections are induced.

In recent years there have been many reports of hospital infections caused by bacteria which represent a normal bacterial flora of the human body. They include *Staphylococcus epidermidis* (S.E.) which colonizes the skin and mucous membranes. S.E. does not excrete tissue damaging toxins, and its pathogenicity is caused by formation of a biofilm. The S.E. related infections are usually chronic and are caused by a contact with a foreign body such as e.g. catheter or implant part. The first stage of the biofilm formation is bacteria adherence to the surface. Next a multi-layered cluster is formed extracellular polysaccharide (EPS) matrix is produced. The mature biofilm is a separate organisation, isolated from the surroundings by a tight impermeable barrier which protects it against external agents, including the cells of the immunological system and the

151

wa polisacharydowa matrix- EPS. Powstały, dojrzały bio-film jest samodzielną organizacją, odgranieczoną od otoczenia szczelną barierą, nieprzepuszczalną dla czynników zewnętrznych, w tym komórek układu immunologicznego i większości antybiotyków. Dlatego też główna strategia walki z zakażeniami powodowanymi przez S.E. polega na profilaktyce. Składają się na nią specjalne procedury higieny podczas zakładania np. cewników, podawanie rutynowo antybiotyków podczas zabiegów chirurgicznych, pokrywanie wszczepianych implantów substancjami antibakteryjnymi. Innym podejściem jest stosowanie przeciwciał przeciwko PIA (polysaccharide intercellular adhesin), swoistej adhezynie biorącej udział w przyleganiu do siebie warstw w biofilmie. Podejmuje się także próby stosowania substancji o własnościach immunomodulacyjnych takich jak interferon gamma.

Niewątpliwie najprostszą metodą zatrzymania wytworzenia biofilmu jest niedopuszczenie do adhezji pierwszej warstwy bakterii do powierzchni materiału. Powszechnie uważa się że to przyleganie powodują wiązania hydrofobowe powstające pomiędzy powierzchnią, najczęściej w przypadku stosowanych plastików hydrofobową, a błoną bakterijną. Stosowanie substancji typu detergenty, które interferują z wiązaniami hydrofobowymi, powoduje zmniejszenie adhezji bakterii do powierzchni.

W naszych badaniach chcieliśmy sprawdzić czy inne metody hamowania powstawania wiązań hydrofobowych poprzez zmianę charakteru powierzchni także spowodują mniejszą adhezję bakterii a przez to zmniejszą warunki do powstawania biofilmu. Do badań stosowaliśmy PSU-hydrofobowy i PSU naświetlany UV-hydrofilowy (PSUN). Oprócz oddziaływań z bakteriami sprawdzaliśmy także reakcje fibroblastów (fb) i osteoblastów (osteo) na taką modyfikację powierzchni.

Materiały i metody

Folie z PSU

Folie z PSU naświetlane 5godz. UV lampą ASH 400

Komórki

Ludzka linia fibroblastyczna HS-5 ATCC CRL-11882

Ludzka linia osteoblastyczna hFOB 1,19 ATCC CRL-11372

Bakterie Staphylococcus epidermidis ATCC 35547

Badanie powierzchni materiałów

Widma UV-VIS-wykonano na spektrofotometrze Hewlett Packard 8452A w zakresie 200-400nm

Widma IR- wykonano na spektrofotometrze Bruker Equinox 55 w zakresie 400-4000 cm^{-1}

Kąt zwilżania oznaczono na aparacie Surftens Universal f-my OEG z użyciem oprogramowania Surftens 3.0

Zdjęcia komórek i bakterii wykonano mikroskopem SEM, JOEL JSM-5400

Techniki komórkowe

Hodowle fibroblastów i osteoblastów w stężeniu 2×10^4 prowadzono na badanych materiałach w 12-dółkowych płytkach hodowlanych.

fb-medium hodowlane: RPMI+15% surowicy płodowej (FCS) temp. 37°C

Osteo-medium hodowlane: 1:1 podłoże Ham F12 i modyfikacja Dulbecco podłoża Eagla bez czerwieni fenolowej+10% FCS. Temp. 34°C

Podłoże wymieniano po czterech dniach a po siedmiu dniach oznaczano żywotność komórek a w supernatantach stężenie kolagenu typu I.

Zdjęcia SEM komórek na badanych powierzchniach wyko-

majority of antibiotics. This is why the main strategy of fighting against S.E. caused infections is prophylactic measures including hygienic procedures during, for example, the insertion of catheters, routine antibiotic use during surgery, coating the implanted devices with antibacterial substances. Another approach is the application of antibodies against PIA (polysaccharide intercellular adhesin), a special adhesin contributing to adhesion of layers within the biofilm. Attempts are also made at applying substances of immuno-modulating properties, such as interferon gamma.

Undoubtedly, the simplest method to stop biofilm formation is to prevent the adhesion of the first layer of bacteria to the material surface. It is commonly believed that this adhesion is caused by hydrophobic interaction between the surface, hydrophobic in case of used plastic materials, and the bacterial membrane. The application of detergent-like substances that interfere with hydrophobic interaction lowers the degree of bacteria adhesion to the surface.

The aim of our investigations was to check whether other methods of impeding hydrophobic interaction formation by changing the character of the surface also lower the bacteria adhesion, which would reduce the conditions for biofilm formation. In our tests we used PSU-hydrophobic and UV radiated PSU (PSUN). Apart from interactions between bacteria we have also analysed the response of fibroblasts (fb) and osteoblasts (osteo) to such modification of the surface.

Materials and methods

PSU foils

PSU foils exposed to 5hr UV radiation with ASH 400 lamp

Cells

Human fibroblastic line HS-5 ATCC CRL-11882

Human osteoblastic line hFOB 1,19 ATCC CRL-11372

Staphylococcus epidermidis ATCC 35547

Investigation of materials surfaces

UV-VIS spectra made with Hewlett Packard 8452A spectrophotometer in the 200-400nm range

IR spectra made with Bruker Equinox 55 spectrophotometer in the 400-4000 cm^{-1} range

Wetting angle determined by Surftens Universal apparatus with Surftens 3.0 software

Photographs of cells and bacteria made under SEM, JOEL JSM-540 microscope

Cellular technics

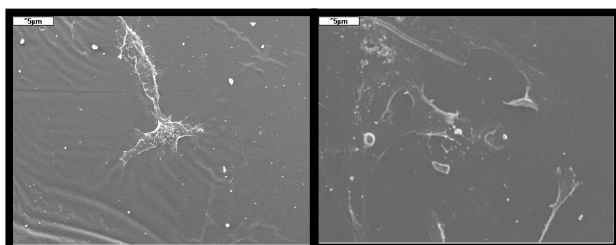
Fibroblast and osteoblast cultures of concentration of 2×10^4 were run in 12-well plates.

fb-culture medium: RPMI+15% fetal serum (FCS) at 37°C
osteo-culture medium: 1:1 medium nutrient Ham F12 and Dulbecco modified Eagle medium nutrient with no phenol red+10% FCS, at 34°C.

The medium nutrient was changed after four days, and after seven days the cell proliferation was determined, in the supernatants the concentration of collagen type I.

SEM photos of cells on the investigated surfaces were taken after three days of culture, after fixation with 2.5% glutaraldehyde, dehydration with increasing concentrations of ethanol and drying the specimens in Anderson apparatus.

2 ml portions of S.E. bacteria of 0.5 density in McFarland scale were put on the tested materials in a 12-well plate and placed in an incubator for 24 hours. Next the materials were rinsed with a buffer solution, and the bacteria were fixed with 3% aldehyde for 15 minutes to be next alcoholized with increasing from 25% to 100% ethanol, and dried



FOT. 1. osteo PSU.

FOT. 2. osteo PSUN.

nywano po trzech dniach hodowli po utrwaleniu 2,5% aldehydem glutarowym, odwodnieniu wzrastającymi stężeniami alkoholu etylowego i wysuszeniu próbek w aparacie Andersona.

Po 2ml bakterii S.E o gęstości 0,5 w skali McFarlanda nakładano na badane materiały w 12-dółkowej płytce hodowlanej i umieszczano na 24 godziny w inkubatorze hodowlanym. Po tym czasie materiały przepłukiwano buforem a bakterie utrwalano 3% aldehydem glutarowym przez 15 min a następnie zadawano wzrastającym od 25% do 100% stężeniem alk.etylowego i suszono na powietrzu przed wykonaniem zdjęć SEM.

Żywołność komórek wykonano przy użyciu zestawu CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay f-my Promega

Stężenie kolagenu typu I oznaczono testem ELISA stosując przeciwciała i standard f-my Bioproducts

Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem testu Fishera i t-Studenta

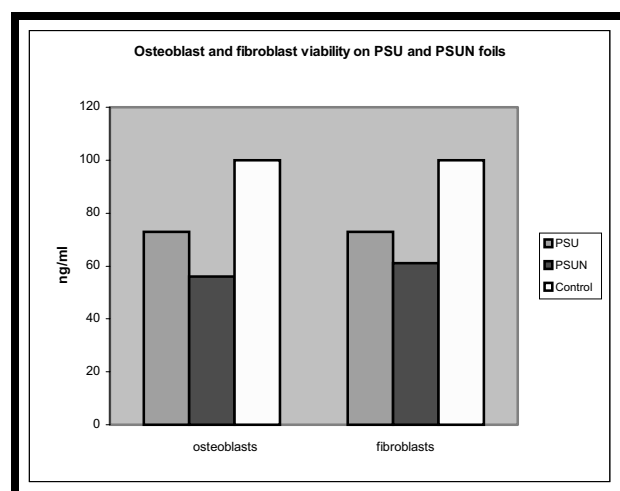
Wyniki i interpretacja

Analiza widm UV i IR wykazała degradację PSU pod wpływem naświetlania promieniowaniem UV, na co wskazują malejące wartości absorpcji w zakresie pasm grupy sulfonowej i eterowej. Stwierdzono także zachodzenie procesu utleniania czego dowodem jest pojawianie się pików dla grupy karboksylowej i hydroksylowej.

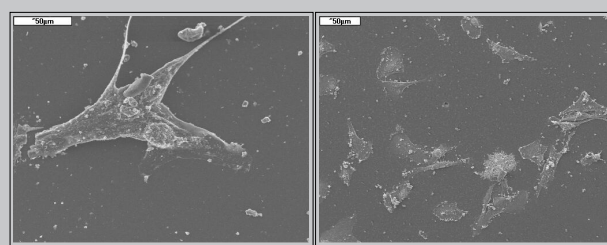
Pomiar kąta zwilżania.

Kąt zwilżania dla powierzchni PSU wynosił $83,96 \pm 0,68$ a dla powierzchni naświetlanej PSUN $14,94 \pm 3,11$

Zarówno analiza spektralna jak i pomiar kąta zwilżania wskazują na zmianę charakteru powierzchni PSU pod wpływem



RYS. 1. Żywołność osteoblastów i fibroblastów.



FOT. 3. fb PSU.

FOT. 4. fb PSUN.

in the air before the SEM pictures were taken.

Cell vitality was tested by means of CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega.

Collagen I concentration was determined by ELISA test using antibodies and Bioproducts standard.

The statistical analysis was made by Fisher test and t-Student.

Results and interpretation

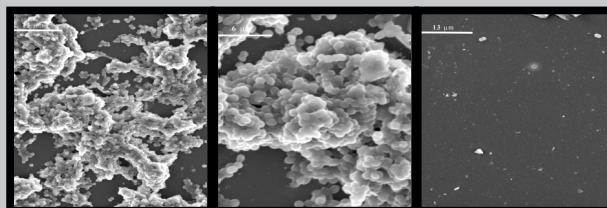
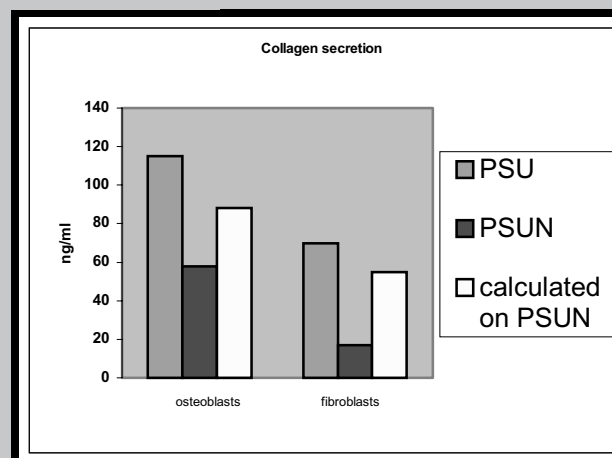
The analysis of UV and IR spectra showed PSU degradation due to exposure to UV radiation, which is proved by the decreasing values of absorbance in the range of the sulfone group and ether bands. The process of oxidation was also observed, which is proved by the appearance of peaks for the carboxyl and hydroxyl groups.

Measurement of wetting angle

The wetting angle for PSU surface was $83,96 \pm 0,68$, for PSUN surface exposed to radiation $14,94 \pm 3,11$.

Both spectral analysis and wetting angle measurement point to the change in the character of the PSU surface under UV radiation from hydrophobic into hydrophilic.

The responses of osteoblasts and fibroblasts to such modi-

FOT.5. PSU
+S.E 35547
(SEM 2000x).FOT.6. PSU
+S.E 35547
(SEM 5000x).FOT.7. PSUN
+S.E 35547
(SEM 2000x).

RYS. 2. Wydzielanie kolagenu przez osteoblasty i fibroblasty.

promieniowania UV z hydrofobowej na hydrofilową. Reakcje osteoblastów i fibroblastów na taką modyfikację przedstawiono na FOT.1-4 i RYS.1

Jak widać na FOT.1-4 oba rodzaje komórek adherują do powierzchni PSU i PSUN i przy pomocy tej metody trudno stwierdzić jakiegokolwiek różnicę w zachowaniu komórek. Żywotność osteoblastów na PSUN jest istotnie obniżona w stosunku do PSU (poziom istotności 0,05), natomiast fibroblasty nie reagują zmianą żywotności na taką modyfikację. Wartości wyprodukowanego kolagenu typu I wraz z wartościami obliczonymi po uwzględnieniu żywotności przedstawiono na RYS.2 Jak widać oba typy komórek produkują mniej kolagenu na PSUN w porównaniu z PSU. Zachowanie bakterii S.E. na PSU i PSUN przedstawiono na FOT.5-7. Bakterie szczepu 35547 wytwarzają po 24 godz. na powierzchni PSU zorganizowaną strukturę biofilmu, natomiast na powierzchni PSUN obserwuje się tylko pojedyncze bakterie.

Wnioski

Modyfikacja folii z PSU poprzez 5 godzinne naświetlanie promieniowaniem UV zmienia charakter powierzchni z hydrofobowej na hydrofilową, co pociąga za sobą zahamowanie syntezy kolagenu przez fibroblasty i osteoblasty, nieznaczne obniżenie żywotności osteoblastów i całkowitą utratę zdolności tworzenia biofilmu przez bakterie *Staphylococcus epidermidis*.

Piśmiennictwo

- [1] Czajkowska B., Kowal J., Błażewicz M., Ptak M., Bobek M., Cieślak J. "The impact of chemical and physical modification of polysulfone surface on cellular reactions in vitro" *Inżynieria Biomateriałów* (2004) 38-42; 157-160.
[2] Harris L.G., Tosatti S., Wieland M., Texor M., Richards R.G. "Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials* (2004) 25;4135-4148.

fications have been shown in PHOTOS 1-4 and FIG.1.

As can be seen in photos 1-4 both types of cells adhere to PSU and PSUN surfaces. With this method it is difficult to observe any differences in cell behaviour relative to the reference sample, polystyrene coat in this case.

Osteoblast proliferation on PSUN is significantly lower than that of PSU (significance level 0,05), while the proliferation of fibroblasts does not change.

The value of the produced collagen I together with the values calculated with proliferation taken into account have been shown in FIG.2. Both types of cells evidently produce less collagen on PSUN than on PSU surfaces.

The behaviour of S.E. bacteria on PSU and PSUN has been shown in photos 7-10. Bacteria strain 35547 produce an organised biofilm on the PSU surface after 24 hours, while on the PSUN surface only individual bacteria are observed.

Conclusions

Modification of PSU foil exposed to 5hr UV radiation changes the character of surface from hydrophobic into hydrophilic, which impedes collagen synthesis by fibroblasts and osteoblasts, causes slightly lower proliferation of osteoblasts and complete loss of ability to form the biofilm by *Staphylococcus epidermidis* bacteria.

References

- [3] Rohde H., Burdelski C., Bartscht K., Hussain M., Buck F. "Induction of staphylococcus epidermidis biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases" *Molecular Microbiology* (2005) 55; 1883-1896.
[4] Vuong C., Otto M. "Staphylococcus epidermidis infections" *Microbes and Infection* (2002), 4; 481-489.

STERYLIZACJA RADIACYJNA POLIURETANÓW STOSOWANYCH W INŻYNIERII TKANKOWEJ

GRAŻYNA PRZYBYTNIK*, EWA KORNACKA*, MONIKA BILL**, JOANNA RYSZKOWSKA**

*INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ,
03-195 WARSZAWA, DORODNA 16,

** WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ,
POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
02-507 WARSZAWA, WOŁOSKA 141.

[*Inżynieria Biomateriałów*, 47-53,(2005),154-157]

Wstęp

Opracowanie rusztowań stosowanych podczas regeneracji tkanek wymaga pełnego zrozumienia procesów chemicznych i fizycznych zachodzących w materiale, z którego zostały wykonane. Jednym z ważniejszych aspektów tworzenia takich kompozycji jest wybór metody sterylizacji

RADIATION STERILIZATION OF POLYURETHANE BASED MATERIALS USED IN TISSUE ENGINEERING

GRAŻYNA PRZYBYTNIK*, EWA KORNACKA*, MONIKA BILL**, JOANNA RYSZKOWSKA**

*INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY,
03-195 WARSZAWA, DORODNA 16,

**FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING,
WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
02-507 WARSZAWA, WOŁOSKA 141.

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),154-157]

Introduction

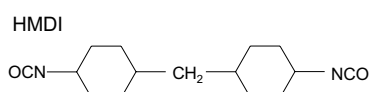
Preparation of scaffolds for tissue regeneration requires better understanding of chemical and physical processes proceeded in the materials. One of the most important aspects of the production of designed resins is sterilization

zastosowanej do usunięcia skażenia mikrobiologicznego. Najbardziej odpowiednie do tego celu wydaje się zastosowanie promieniowania jonizującego, które penetruje nie tylko powierzchnię polimeru, ale również całą objętość napromieniowanego obiektu. Już dawka 25 kGy skutecznie eliminuje poziom zawartych zanieczyszczeń mikroorganizmów. Jednak proces ten inicjuje również inne zmiany, pożądane i niepożądane, w napromieniowanym materiale prowadzące odpowiednio albo do jego usieciowania lub degradacji. Sieciowanie zmienia liniowy polimer w trójwymiarową cząsteczkę, co powoduje zmniejszenie rozpuszczalności w rozpuszczalnikach organicznych, a także poprawę właściwości mechanicznych. Natomiast w wyniku procesu degradacji ciężar cząsteczkowy maleje, a właściwości materiału ulegają pogorszeniu.

Elastomery poliuretanowe w zakresie dawek sterylizacyjnych są materiałami odpornymi radiacyjnie [1,2]. Jednakże, jeśli w układzie pojawią się dodatkowe segmenty estrowe, wtedy wpływ promieniowania jest trudny do przewidzenia. Zatem podjęto metodą EPR badanie wolnych rodników generowanych przez promieniowanie jonizujące w kopolimerze uzyskanym z następujących komponentów: alifatycznego diizocyjanianu, poli ϵ -kapolaktonu i glikolu etylenowego. Poddany sterylizacji materiał składa się ze sztywnych segmentów zawierających grupy uretanowe i miękkich hydrofilowych segmentów z grupami estrowymi. W celu zidentyfikowania pierwotnych i wtórnych produktów uzyskanych kopolimerów ich widma były porównywane z sygnałami EPR surowców.

Materiały i metody

Poliuretany sporządzono z diizocyjanianu dicykloheksylometanu (HMDI), poli ϵ -kapolaktonu (PCL) i glikolu etylenowego (EG). W otrzymanych elastomerach składniki występują w następujących proporcjach molowych HMDI:PCL:EG=4:1:3 dla polimeru P413 i 2:1:1 dla polimeru P211. Średni ciężar cząsteczkowy oligomeru PCL wynosił 1250 w elastomerze P413 i 530 w P211.



Napromieniowane w ciekłym azocie próbki umieszczone w dewarze palcowym badano metodą EPR w spektrometrze ESP 300 z wnękią prostokątną TE 102. Liczba akumulacji i wzmocnienie były dostosowywane każdorazowo do intensywności sygnału. Względne stężenie i analiza widm eksperymentalnych była przeprowadzona za pomocą programu Apollo poprzez porównanie drugich pochodnych widm. Zanik rodników był monitorowany po ogrzaniu próbek do temperatur wskazanych na rysunkach. Pomiarów kąta zwilżania dokonano przy użyciu tensjometru firmy Krüss.

Wyniki

Badania były przeprowadzone w warunkach kriogenicznych, gdyż rodniki w temperaturze otoczenia okazały się nietrwałe i szybko zanikały tworząc produkty diamagnetyczne. Widma otrzymane w 77K wskazują, że w obu badanych materiałach co najmniej część rodników jest taka sama. Początkowo dominującym składnikiem widm jest słabo rozdzielony triplet, którego linie dzieli 1.15 mT. Rodniki P211 szybciej ulegają utlenieniu tworząc rodnik nadtlenny już powyżej 160K, podczas gdy w P413 produkt ten pojawia się dopiero w 190K. Zanika on do 280K, równoległe z pro-

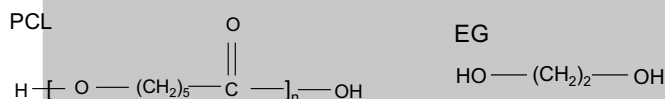
necessarily to eliminate bioburdens not only from the surface but from the scaffold inside as well. The most appropriate seems to be application of ionising radiation that, penetrating whole volume of material after a dose of 25 kGy, efficiently limits level of microorganisms. However such treatment induces many undesired and desired reactions that lead either to degradation or crosslinking of macromolecules (respectively). Crosslinking transforms a linear polymer into a three-dimensional molecule, resulting in lower solubility in organic solvents and improvement of mechanical properties. On the other hand, the decrease in molecular weight is a consequence of degradation and leads to worsening of polymer properties.

Elastomeric polyurethanes are known to be radiation stable materials in sterilizing dose range [1,2]. Nevertheless, if additional components appear in the system, e.g. segments of polyesters, then the influence of irradiation is unpredictable. Thus, we have studied free radicals generated by ionizing radiation in copolymers synthesized from bis-(4-isocyanatocyclohexyl), poly(ϵ -caprolactane)diol and ethylene glycol using for their detection EPR method. The copolymers consist of urethane hard units and ester hydrophilic soft segments. In order to identify paramagnetic primary and secondary intermediates the constituents were examined and their spectra were compared to the experimental signals of the resulting resin.

Materials and methods

The polyurethane based materials were prepared from bis-(4-isocyanatocyclohexyl) (HMDI), poly(ϵ -caprolactane)diol (PCL) and ethylene glycol (EG) used as a chain-extending agent. The resulting elastomers contain the components of the following molar ratios HMDI:PCL:EG=4:1:3 for P413 and 2:1:1 for P211. PCL oligomers have various molecular weights - 1250 in P413 and 530 in P211.

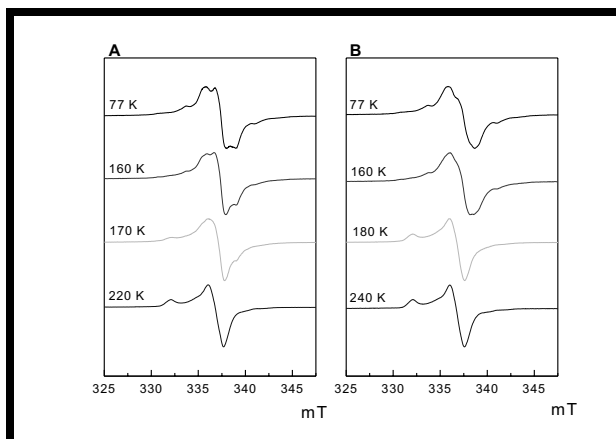
Irradiated at liquid nitrogen samples were inserted into dewar and measured using EPR spectrometer ESP 300 with rectangular cavity TE102. The number of accumulations and



amplification was always adjusted according to the intensity of the signal. Relative radical concentrations and analysis of the experimental spectra were performed by comparison of the spectral areas obtained by double integration using the program Apollo. Decay of radicals was monitored upon annealing to temperatures indicated in the figures. The contact angle was measured with a tensiometer K100C, Krüss.

Results

The measurements were carried out under cryogenic conditions since the radicals generated at ambient temperature were unstable and decay fast to diamagnetic species. Spectra recorded at 77K indicate that in both studied materials at least part of radicals is identical (FIG.1). The dominant component of spectrum measured at 77K is an unresolved triplet that lines are separated by approximately 1.15 mT. P211 radicals oxidise faster forming peroxy radicals just above 160K whereas in P413 such product appears already at 190K. They can be detected to 280K together with radical that appears in the same range of temperatures and exhibits a wide signal of low intensity.

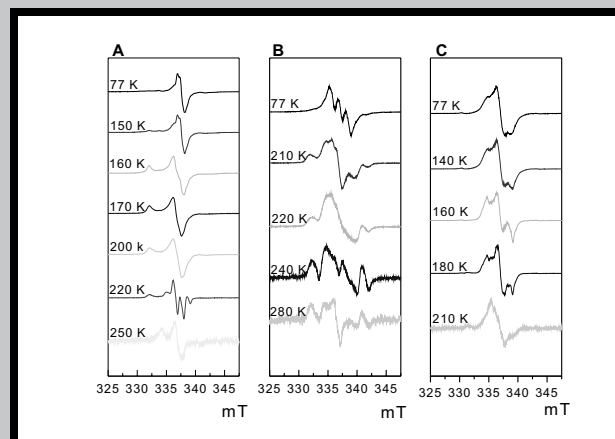


RYS. 1. Widna EPR napromienianego kopolimeru poliuretanu (A) P211 i (B) P413 zmierzone w 77K i po ogrzaniu do wskazanych temperatur.

FIG. 1. EPR spectra of irradiated polyurethane based materials (A) P413 and (B) P211 detected at 77K and following annealing to indicated temperatures.

duktem powstającym w przedziale temperatur 160-200 K i wykazującym szeroki sygnał o małej intensywności. Powyżej 130K zanik wszystkich rodników zachodzi proporcjonalnie do wzrostu temperatury, co wskazuje na stopniową rekombinację produktów paramagnetycznych do diamagnetycznych. Widna doświadczalna składają się z superpozycji absorpcji wielu rodników, co w przypadku kopolimerów jest efektem oczekiwanym. Aby jednoznacznie zidentyfikować poszczególne rodniki i mery odpowiedzialne za lokalizację spinu przeprowadzono dodatkowe badania surowców. Stwierdzono, że trzy linie o dużej intensywności występujące w kopolimerach należą do segmentów kaprolaktonu, co wskazuje, że procesy indukowane promieniowaniem jonizującym nie zachodzą addytywnie, a estry są składnikami kopolimeru najbardziej wrażliwymi na promieniowanie. Niesparowane elektrony nie są przenoszone pomiędzy segmentami, ponieważ szeroki sygnał wyraźnie obserwowany w wysokich temperaturach (poza asymetrycznym widmem rodnika nadtlenkowego) również odpowiada cząsteczce kaprolaktonu. Biorąc pod uwagę wagowy stosunek komponentów HMDI:PCL:EG, który dla P413 wynosi 47:47:7, a dla P211 43:50:7, można oczekiwać porównywalnych udziałów rodników uretanowych i estrowych. Jednak stężenie rodników uretanowych nie przekracza 10%. Ich widmo w postaci dwóch linii oddległych o 2,20 mT świadczy prawdopodobnie o obecności rodnika -CH^\bullet - usytuowanego pomiędzy dwoma grupami cykloheksylu [3].

Analiza widm badanych materiałów i ich surowców wskazuje, że rodnik nadtlenkowy występujący w kopolimerach tworzy się głównie w wyniku utleniania rodnika dimetyloheksylowego, podczas gdy rodniki PCL są bardziej odporne na utlenianie. Rodniki COO^\bullet są prekursorami grup polarnych i determinują właściwości powierzchniowe, w tym kąt zwilżania. Jednak jego średnia wartość dla wody rośnie po napromienianiu z 85 deg do 95 deg. Dlatego wydaje się, że sterylizacja radiacyjna wpływa równocześnie na degradację występujących w materiałach grup polarnych, co może prowadzić do pogorszenia adhezji komórek na powierzchni kopolimerów.



RYS. 2. Widna EPR (A) diizocyjanianu, (B) poliε-kaprolaktonu diolu i (C) glikolu etylenu.

FIG. 2. EPR spectra of (A) bis-(4-isocyanatocyclohexyl) (HMDI), (B) poly(ε-caprolactane)diol and (C) ethylene glycol.

Above 130K the decay of radicals proceeds proportionally to annealing temperature suggesting gradual recombination of the paramagnetic products to diamagnetic ones. The experimental spectra consist of overlapping absorption of many radicals which is typical for copolymers. Additional studies were necessary to identify unambiguously the individual radicals and the constitutional units of copolymer that are responsible for the localisation of unpaired spin. We found that the three lines of high intensity observed in the spectra of copolymers belong to the poly(ε-caprolactane) segment what indicates that upon irradiation the effects are not additive and the most sensitive seems to be ester moieties. The unpaired electron is not transferred towards other units because wide signal distinctly observed at the highest temperatures (except characteristic asymmetric structure of the peroxy radical) corresponds to caprolactane moiety. Taking into account weight ratios HMDI:PCL:EG in the copolymers, which are equal 46:47:7 for P413 and 43:50:7 for P211, the comparable participation of urethane and ester radical might be expected. However the content of urethane radicals is low and does not exceed 10%. Its spectrum in form of two lines separated by 2.20 mT represents probably -CH^\bullet radical and spin is located at carbon linking two hexyl groups [3].

Upon analysis of the spectra obtained for the resulting materials and their constituents we have concluded that peroxy radical detected in copolymers is formed predominantly after oxidation of dihexylmethyl radical, whereas PLC radicals are much more resistant towards oxidation.

The COO^\bullet species are the precursors of polar functional groups that determine surface properties and influence on the contact angle. However the average value of the parameter measured for water increases upon irradiation from 85 deg to 95 deg. Therefore radiation sterilization probably destroys polar groups occurring in the materials what slightly weakens cell adhesion on their surface.

Conclusion

Induced by gamma-irradiation damages in two urethane based materials have been investigated by EPR spectroscopy. Results confirmed that the urethane segments are resistant towards ionising irradiation and the presence of ester units facilitates generation of free radicals. It was also found that in PCL segments ionising radiation induces

Wnioski

Indukowane promieniowaniem jonizującym zmiany w materiałach syntetyzowanych na bazie poliuretanu badano metodą spektroskopii EPR. Wyniki wskazują na wysoką odporność radiacyjną segmentów uretanowych i wzrost całkowitego stężenia rodników w obecności estrów. Stwierdzono, że w PCL promieniowanie jonizujące prowadzi do powstania rodników, dzięki którym materiał może ulegać sieciowaniu powodując jego mniejszą biodegradowalność. Zwiększenie kąta zwilżania wskazuje, że materiały stają się bardziej hydrofobowe, co nie sprzyja adhezji komórek.

Podziękowanie

Praca finansowana w ramach projektu zamawianego Ministra Nauki i Informatyzacji (grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002/06).

WPŁYW STERYLIZACJI RADIACYJNEJ NA WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE POLIURETANÓW DO ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZNYCH

JOANNA RYSZKOWSKA*, MONIKA BIL*, GRAŻYNA PRZYBYTNIK**

*POLITECHNIKA WARSZAWSKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, WOŁOSKA 141, 02-507 WARSZAWA:

JRYSZ@MEIL.PW.EDU.PL,

**INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ, DORODNA 16, 03-195 WARSZAWA

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),1573-159]

Wprowadzenie

Radiacja promieniami gamma lub przyspieszonymi elektronami jest najczęściej stosowanym procesem sterylizacji materiałów polimerowych do zastosowań biomedycznych. Wysoka energia promieniowania może mieć znaczący wpływ na właściwości sterylizowanych materiałów. Dwa podstawowe procesy zachodzące w polimerach pod wpływem radiacji to rozrywanie łańcuchów makrocząsteczek oraz tworzenie fizycznych i chemicznych wiązań sieciujących. W rezultacie prowadzi to do istotnych zmian właściwości chemicznych i fizycznych takich jak: zmiana ciężaru cząsteczkowego, funkcjonalności wiązań, wytrzymałości, twardości, odporności termicznej i chemicznej [1]. Rodzaj zmian zachodzących w polimerze będzie przede wszystkim zależny od budowy chemicznej polimeru.

Głównym procesem zachodzącym w poliuretanach (PUR) pod wpływem radiacji jest degradacja prowadząca do zmniejszenia wytrzymałości i wydłużenia. Odporność poliuretanów na promieniowanie zależy od liczby pierścieni aromatycznych i koncentracji grup estrowych w makrocząsteczce [2]. W pracy Shintani [3] stwierdzono, że w poliuretanach wydłużanych butanodiolom pod wpływem sterylizacji radiacyjnej zachodzi przede wszystkim proces degradacji prowadzący do zmniejszenia ciężaru cząsteczkowego a w rezultacie wytrzymałości na rozciąganie. Spada również stopień krystaliczności. W pracy Gorna et al. [4] zbadano wpływ standardowej dawki promieniowania (25 kGy) stosowanej do sterylizacji biomateriałów, na biodegradowalne poliuretany o różnym stosunku segmentów hydrofilowych

significant amount of radicals that can introduce crosslinking into these molecules and reduce ability to biodegradation. The increase in water contact angle suggests that the surface of the irradiated materials become more hydrophobic.

157

Acknowledgement

This work was supported by the Minister of Science and Information Society Technologies (grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002/06).

Piśmiennictwo

- [1] Cooke D.W. et al., Radiat. Phys. Chem. 55 (1999) 1-13.
- [2] Shintani H., Nakamura A., J. Appl. Polym. Sci. 42 (1991) 1979-1987.
- [3] Gorna K., Gogolewski S., Polym. Degrad. Stab., 79 (2003) 465-474.

References

THE EFFECT OF RADIATION ON PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF POLYURETHANES FOR MEDICAL APPLICATIONS

JOANNA RYSZKOWSKA*, MONIKA BIL*, GRAŻYNA PRZYBYTNIK**

*WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, WOŁOSKA 141, 02-507 WARSAW: JRYSZ@MEIL.PW.EDU.PL

**INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, DORODNA 16, 03-195 WARSAW

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),157-159]

Introduction

Gamma and electron-beam radiation is the most common method of sterilization of polymer materials for biomedical applications. High-energy of radiation can have a significant influence on properties of sterilized materials. Two basic processes occurring under radiation are: macromolecules chain breaking and physical and mechanical crosslinking. As a result it leads to significant changes of chemical and physical properties including: molecular weight, functionality, tensile strength, hardness, chemical and thermal resistance [1]. Types of changes occurring in polymer depend mainly on chemical structure of polymer.

The main process occurring in polyurethane (PUR) under the radiation is the degradation leading to decrease of elongation and tensile strength. Polyurethane resistance for radiation depends on the number of aromatic rings and the concentration of ester groups in macromolecule [2]. Shintani et al. [3] reported that polyurethanes chain-extended with 1,4-butanediol mainly degrade under sterilization what lead to loss of molecular weight and as a result decrease of stress breaking. The degree of crystallinity decreases as well. Gorna et al. [4] investigated influence of standard dose (25kGy) of gamma radiation for biomaterial sterilization, on biodegradable polyurethane with various ratio of hydrophilic-to-hydrophobic segments. It showed that changes in molecular weight, tensile strength and thermal properties caused by radiation depend on polyurethane chemical structure.

do hydrofobowych. Stwierdzono, że zmiany ciężaru cząsteczkowego, wytrzymałości i właściwości termicznych spowodowane promieniowaniem zależą od budowy chemicznej poliuretanów.

W prezentowanej pracy zbadano wpływ sterylizacji strumieniem elektronów dawką 25kGy i 50kGy na poliuretany o różnej długości łańcucha polioliu wytypowane w trakcie wcześniejszych badań do wytwarzania skafoldów do hodowli tkanki kostnej [5,6].

Metodyka badań

Materiały

Do syntezy zastosowano następujące substraty: 4,4'-diizocyjanian dicykloheksylometanu HMDI, poli(ϵ -kaprolaktono)diol (PCL) o masie cząsteczkowej $M_n=530$, 1250, dialaurynian dibutylocyny (Aldrich Chemical Co. Germany). Polioli bezpośrednio przed syntezą odwadniano w temperaturze 120°C pod próżnią przy ciągłym mieszaniu. Glikol etylenowy GE (POCH Gliwice) suszono nad sitami molekularnymi.

Synteza poliuretanów

W procesie syntezy przeprowadzonej metodą prepolymerową w masie, otrzymano poliuretany o stosunku moliowym diizocyjanianu do polioliu 4:1 dla PCL $M_n \sim 1250$ oraz 2:1 dla PUR $M_n \sim 530$ oznaczone odpowiednio symbolami PUR4PCL1250 i PUR2PCL530.

Sterylizacja radiacyjna

Sterylizację próbek poliuretanowych (25kGy, 50kGy) przeprowadzono wiązką elektronów w temperaturze pokojowej w akceleratorze Elektronika 10/10. Właściwości PUR oceniano po dwóch tygodniach od napromienienia.

Absorpcja wody

Chłonność wody polimerów badano w wodzie destylowanej w temperaturze 38°C. Próbki przed pomiarem suszono do stałej masy. Próbki ważono na wadze analitycznej po 24 godzinach przebywania w wodzie. Zmianę masy próbek po przebywaniu w wodzie obliczano według wzoru: $\Delta m = (m_1 - m_0)/m_0 \times 100$ gdzie: m_0 i m_1 masa odpowiednio suchej i mokrej próbki. Z każdego typu polimeru badano trzy próbki a wynik uśredniano.

Kąt zwilżania

Kąt zwilżania dla wody oznaczono metodą kropli kładzionej. Pomiar przeprowadzono w temperaturze pokojowej. Wartość kąta odczytywano za pomocą goniometru PGX. Wynik jest średnią arytmetyczną z sześciu pomiarów.

Właściwości mechaniczne

Wytrzymałość na rozciąganie badano na maszynie wytrzymałościowej Instron typu 1115. Zastosowano standardowe próbki, zgodnie z normą ISO527.

Analiza termiczna-MDSC

Pomiary MDSC przeprowadzono na kalorymetrze DSCQ1000 firmy TA Instrument. Próbki o masie około 10 mg były ogrzewane z szybkością 40/min, amplituda oscylacji wynosiła 1°C, okres oscylacji 40s. Błąd oznaczenia temperatury zeszklenia wynosi $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

Wyniki badań i dyskusja

W wyniku sterylizacji radiacyjnej zmniejsza się hydrofiliowość PUR4PCL1250 o czym świadczy spadek chłonności wody oraz wzrost wartości kąta zwilżania (TABELA1).

In presented work the influence of sterilization with electron-beam 25kGy, 50kGy on polyurethanes based on polyol with different chain length was researched. These polyurethanes were chosen, on the ground of earlier studies [5,6] on manufacturing scaffold for growing bone tissue.

Experiments

Materials

The following reactants were used in the synthesis of polyurethanes: 4,4'-methylene bis (p-cyclohexyl isocyanate) (HMDI), poly(ϵ -caprolactone)diol (PCL) $M_n \sim 530$, 1250, dibutyltin dilaurate (DBTDL) purchased from Aldrich Chemical Co. Germany. Polyol was dehydrated during mixing under vacuum for two hours at 120°C. Ethylene glycol (EG) (POCH, Gliwice) was dried under molecular sieve. The others chemicals were used as received.

Synthesis of polyurethanes

Polyurethanes synthesized in mold by two step process. Polyurethanes with molar ratio diisocyanates to polyol 4:1 for PCL $M_n \sim 1250$ and 2:1 for PCL $M_n \sim 530$ assigned PUR4PCL1250 and PUR2PCL530 were obtained.

Sterilization

The polyurethane samples were sterilized (25kGy, 50kGy) using electron beam at room temperature in Electronika 10/10. The properties of PUR were measured after two weeks from radiation.

Water absorption

Water absorption of polymers was examined at 37°C in distilled water. The samples before immersion were dried to constant mass. They were removed from water after 24 hours, wiped gently with filter paper and weighted using an analytical balance. The samples mass change resulting from the water uptake was calculated according to the formula: $\Delta m = (m_1 - m_0)/m_0 \times 100\%$, where: m_0 and m_1 are the masses of dry and wet samples, respectively.

Contact angle

Contact angle was measured at room temperature for water. The value of contact angle was performed by goniometer PGX. The value is an arithmetic mean of six measurements.

Mechanical properties

The mechanical properties; tensile strength, elongation at break, were measured using INSTRON 1115 machine. Standard samples, according to ISO527 were used

Thermal analysis-MDSC

MDSC measurements were performed via TA Instruments model DSCQ1000 equipped with a liquid nitrogen cooling unit. The samples with average weight of 10.0 mg were scanned at a ramp rate 40°C/min, oscillation amplitude 1°C and oscillation period 40s. Temperature accuracy $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

Results and discussion

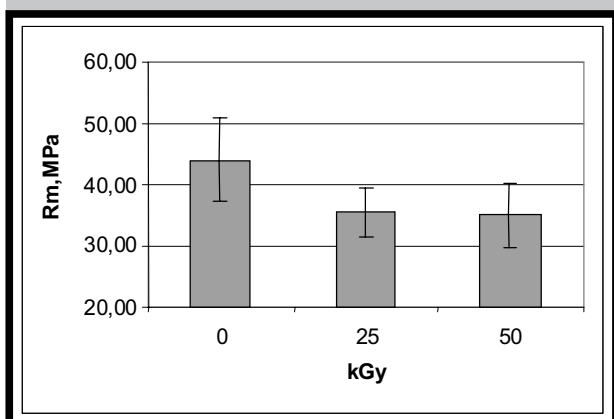
The irradiated PUR4PCL1250 is more hydrophobic which is proved by the decrease of water absorption and increase in contact angle (TABLE1).

This can be due to breakage of macromolecule chain at urethane bond and decreasing of amount of polar groups. For PUR2PCL530 water absorption and contact angle increases with increasing dose of radiation (TABLE1). It can

Rodzaj polimeru Type of polymer	Dawka promieniowania Radiation dose [kGy]	Chłonność wody Water absorption [%]	Kąt zwilżania Contact angle [°]
PUR4PCL1250	0	1,96±0,04	92,9±4,9
	25	1,91±0,14	108,8±2,9
	50	1,79±0,9	111,4±2,1
PUR2PCL530	0	1,70±0,04	100,8±1,7
	25	1,76±0,04	114,7±1,4
	50	1,80±0,10	111,1±0,8

TABELA.1 Wpływ sterylizacji radiacyjnej na hydrofilowość PUR.

TABLE1. Influence of radiation sterilization on hydrophilicity of PUR.



RYS. 1. Wytrzymałość na rozciąganie PUR2PCL530.

FIG. 1. Tensile strength of PUR2PCL530.

Może to świadczyć o rozrywaniu makrocząsteczek w ugrupowaniu uretanowym i zmniejszaniu ilości grup polarnych. Dla PUR2PCL530 (TABELA1) chłonność wody i kąt zwilżania rośnie ze wzrastającą dawką promieniowania. Może to być spowodowane reorganizacją domen, a w rezultacie migracją hydrofobowych segmentów giętkich na powierzchnię materiału.

Wytrzymałość na rozciąganie badanych materiałów zmniejsza się w porównaniu do próbek w stanie wyjściowym (RYS.1,2). Temperatury zeszklenia segmentów miękkich (T_{g1}) badanych poliuretanów obniżają się wraz ze wzrostem dawki promieniowania, a segmentów sztywnych (T_{g2}) przesuwają się w kierunku wyższych temperatur co może świadczyć o postępującym rozdziale fazowym (TABELA 2).

Podziękowania

Praca finansowana z grantu badawczego zamawianego grant KBN-082/T08/2002.

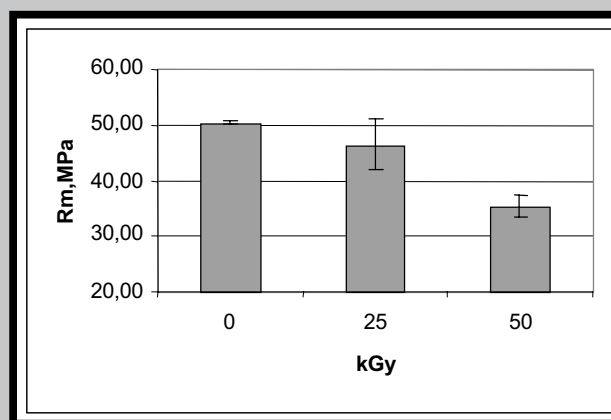
Piśmiennictwo

- [1] K.J. Hemmerich; Medical Device & Diagnostic Industry Magazine.
- [2] S. Pierpoint, J. Silverman et al: Radiation Physics and Chemistry 62 (2001) 163-169.
- [3] H. Shintani: Radiation Physics and Chemistry 47 (1996) 139-148.

Rodzaj PUR Type of PUR	Dawka promieniowania Radiation dose [kGy]	T_{g1} [°C]	T_{g2} [°C]
PUR2PCL530	0	28.4	207.1
	25	23.3	234.9
	50	22.6	235.9
PUR4PCL1250	0	1.9	206.1
	25	-2.5	228.4
	50	-5.0	234.3

TABELA 2. Wpływ sterylizacji radiacyjnej na charakterystykę termiczną PUR.

TABLE 2. Influence of radiation sterilization on PUR thermal characteristics.



RYS. 2. Wytrzymałość na rozciąganie PUR4PCL1250.

FIG. 2. Tensile strength of PUR4PCL1250.

be caused by reorganization of domains and as result migration of hydrophobic soft segments towards surface.

Tensile strength of irradiated materials decreases in comparison with samples before sterilization (FIG.1,2). Glass transition temperatures of soft segments (T_{g1}) of researched polyurethanes decreases together with the increase of radiation dose and glass transition temperatures of hard segments (T_{g2}) move in the direction of higher temperatures, which can prove better phase separation.

Acknowledgments

This research was financed from research grand KBN-082/T08/2002.

References

- [4] K. Gorna, S. Gogolewski: Polymer Degradation and Stability 79 (2003) 465-474.
- [5] M.Bil, J.Ryszkowska: Pomerania-Plast 2-4 czerwca 2004 Szczecin-Międzyzdroje.
- [6] M. Bil, J. Ryszkowska et al: E-MRS Fall Meeting 6-10 September, 2004, Warszawa.

CHARAKTERYSTYKA ORTOPEDYCZNYCH KLAMER ZE STOPU TiNiCo Z PAMIĘCIĄ KSZTAŁTU

Z. LEKSTON*, B. WÓJCIK**, H. MORAWIEC*

*INSTYTUT NAUKI O MATERIAŁACH, UNIwersYTET ŚLĄSKI,
40-007 KATOWICE, BANKOWA 12

**ODDZIAŁ CHIRURGII URAZOWO-ORTOPEDYCZNEJ,
SZPITAL MIEJSKI NR 1, 41-200 SOSNOWIEC, ZEGADŁOWICZA 3

Streszczenie

Na podstawie analizy budowy układu kostnego narządów ruchu wytypowano szczególne przypadki złamań w obrębie kończyn, które z powodów biomechanicznych mogą być skutecznie ustabilizowane na czas zrostu implantami NiTi z pamięcią kształtu. W indukcyjnym piecu próżniowym wytopiono i odlano stop TiNiCo o pożądanym składzie chemicznym, z którego po walcowaniu na gorąco i przeciąganiu uzyskano pręty i druty o różnych średnicach. Dobrano optymalne warunki obróbki cieplno-mechanicznej dla uzyskania półfabrykatów do przygotowania implantów odzyskujących kształt po wpływie ciepła ciała. Zaprojektowano i wykonano klamry do stabilizacji osteotomii klinowej kości piszczelowej oraz klamry o różnych rozmiarach do zespołów złamań drobnych kości ręki lub stopy. Zmierzono siły oddziaływań klamer podczas odzysku kształtu w temperaturze pokojowej i w 37°C.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),160-163]

Wstęp

Kompresyjne klamry z pamięcią kształtu wykonane ze stopów NiTi są najprostszymi i szeroko stosowanymi implantami do wewnętrznej stabilizacji złamań kości [1-4]. Najczęściej wykorzystuje się je w leczeniu różnych śródstawowych złamań kości. Ip i in. [5] zaproponowali użycie wewnętrznego implantu ze stopu NiTi z pamięcią kształtu w śródstawowych złamaniach paliczków. Badania biomechaniczne wykazały, że małe wewnętrzne implanty NiTi zapewniają osiową siłę dystrykcyjną w poprzek stawu i utrzymują palec w pożądanej, wyprostowanej pozycji. Czu i in. [6] przedstawili pozytywne wyniki leczenia śródstawowych złamań paliczków. Nie stwierdzono uszkodzeń lub obłuzowania klamer, miejscowych reakcji tkankowych lub infekcji. Klamry usunięte po wyleczeniu złamań nie wykazywały śladów korozji. Badania histopatologiczne nie ujawniły żadnych znaków niepoemyślnych efektów w otaczających tkankach.

Dotychczasowe, pozytywne wyniki zastosowań implantów ze stopów NiTi z pamięcią kształtu do zespołów złamań kości żuchwy, uzyskane w eksperymentalnych i klinicznych badaniach przeprowadzonych w Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej Śląskiej Akademii Medycznej, pozwalają na przeniesienie tych doświadczeń na pozostałą część układu kostnego narządów ruchu [7].

Materiał i metody badań

W badaniach wykorzystano stop Ti-48.7%atNi-1.3%atCo wytopiony w próżniowym piecu indukcyjnym. Pręty i druty uzyskano poprzez walcowanie na gorąco i przeciąganie do średnic pomiędzy 4 i 1 mm. Zastosowano różne tempera-

CHARACTERIZATION OF ORTHOPAEDIC STAPLES FROM TiNiCo SHAPE MEMORY ALLOY

Z. LEKSTON*, B. WÓJCIK**, H. MORAWIEC*

*INSTYTUT NAUKI O MATERIAŁACH, UNIwersYTET ŚLĄSKI,
40-007 KATOWICE, BANKOWA 12

**ODDZIAŁ CHIRURGII URAZOWO-ORTOPEDYCZNEJ,
SZPITAL MIEJSKI NR 1, 41-200 SOSNOWIEC, ZEGADŁOWICZA 3

Abstract

Based on the analysis of the structure of the skeletal system of motor organs specific cases of limb fractures which for biomechanical reasons can be successfully stabilized for the synostosis period with NiTi shape memory implants were singled out. The TiNiCo alloy of required chemical assay was smelted and cast in the induction vacuum furnace. Hot rolling and drawing were used to make rods and wires of different diameters. Optimum conditions for thermo-mechanical treatment, needed to obtain semi-finished products used to prepare implants regaining shape when influenced by the body heat, were established. Staples for the stabilization of cuneiform osteotomy of the tibial bone and staples of different sizes for the osteosynthesis of fractures of small hand or foot bones were designed and produced. Interaction forces were measured when the staples regained shape during heating at room temperature and at 37°C.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),160-163]

Introduction

Shape memory compression staples made from NiTi alloys are the simplest and widely used implants for internal stabilization of bone fractures [1-4]. They are most often used in the treatment of various intra-articular fractures of bones. Ip et al. [5] proposed the use of NiTi shape memory alloy internal implant for intra-articular fractures of phalanx. Biomechanical tests show that small internal NiTi implants provide axial distraction force across the finger joint and hold the finger in the desired right position. Chu et al. [6] reported that satisfactory results were obtained clinically for the treatment of intra-articular fractures. No case of breakage or loosening of the staples, local foreign body reaction or infection were observed. The staples removed after the fracture was healed showed no corrosion. Histological examination did not reveal any signs of adverse effects on the surrounding tissues.

Current positive use of NiTi alloy shape memory implants for treating mandible fractures obtained in experimental and clinical tests carried out in the Clinic of Maxillofacial Surgery of the Silesian Medical Academy allow to apply this kind of experience to the remaining part of the skeletal system of the motor organs [7].

Material and methods

In the present study the vacuum induction melted Ti-48.7%atNi-1.3%atCo alloy was used. The rods and wires from ingot were obtained by hot-rolling and drawing to diameters between 4 and 1mm. Various temperatures and times of heat treatments to obtain the wires with the recovery temperature below body temperature were used. The

tury i czasy obróbki cieplnej dla uzyskania drutów z temperaturą odzysku kształtu poniżej ciepła ciała. Przebieg przemian fazowych i temperatury charakterystyczne rejestrowano metodą DSC po każdej obróbce cieplnej. Temperaturę i kąt odzysku kształtu drutów odkształconych w stanie martenzytycznym, po zanurzeniu ich w oziębionym, suchym lodem, alkoholu etylowym mierzono podczas nagrzewania. Siły kompresyjne klamer mierzono na maszynie Instron i na skomputeryzowanym stanowisku pomiarowym wyposażonym w tensometryczny przetwornik siły i transformatorowy czujnik przemieszczeń liniowych.

Wyniki

Przyjęto, że zastosowanie klamer z pamięcią kształtu do wewnętrznego zespolenia złamanych kości powinno zapewnić stabilną osteosyntezę niektórych złamań. Wewnętrzne zespolenie umożliwia wczesne rozpoczęcie usprawniania i rehabilitacji oraz ograniczenie skutków "choroby połamaniowej" tj. obrzęków, zakrzepicy żyłnej, zaników mięśniowych, odwapnienia układu kostnego i przykurczów stawowych. Dotychczas stosowane wszczepy kostne spełniają te warunki lecz w niektórych, wybranych przypadkach implanty wykazujące pamięć kształtu mogą poprawić warunki fiksacji, zmniejszyć inwazyjność chirurgiczną i ułatwić zabieg operacyjny.

Wielu złamaniom towarzyszy uszkodzenie miejsc przyczepów struktur okołostawowych, jak: więzadeł, torebek stawowych i ścięgien warunkujących zbornosć stawu i transmisję siły mięśniowej. Właśnie w tych przypadkach, gdzie rozmiary fragmentów uszkodzonej tkanki kostnej uniemożliwiają stabilizację śrubą, płytą, drutem Kirsznera, choćby najmniejszych rozmiarów, wprowadzenie klamry z pamięcią kształtu zapewni pożądaną stabilność.

W kończynie górnej tego rodzaju implanty można zastosować w złamaniach guzka większego, nadkłykcia bocznego i przyśrodkowego kości ramiennej, wyrostka łokciowego, wyrostka rylcowatego kości promieniowej, złamaniach odstawowych i pozastawowych kości śródręcza, złamaniach odstawowych i trzonów kości paliczków.

W osteosyntezach kończyny dolnej implanty z pamięcią kształtu mogą znaleźć zastosowania w brzeźnych złamaniach kłykci kości piszczelowej, głowy strzałki, kostki przyśrodkowej i bocznej голени, złamaniach kości piętowej i stępu, podstaw i przynasad dalszych kości śródstopia, śród-

courses of phase transitions and their characteristic temperatures were measured by DSC method for each heat treatment. The temperature and the shape recovery angle of the wires deformed in the martensitic state after immersing them in ethanol cooled down with the use of dry ice were measured during heating. Compression forces of staples were measured by Instron machine and on the computerized measuring point equipped with Hottinger force converter and Peltron linear displacement transducer.

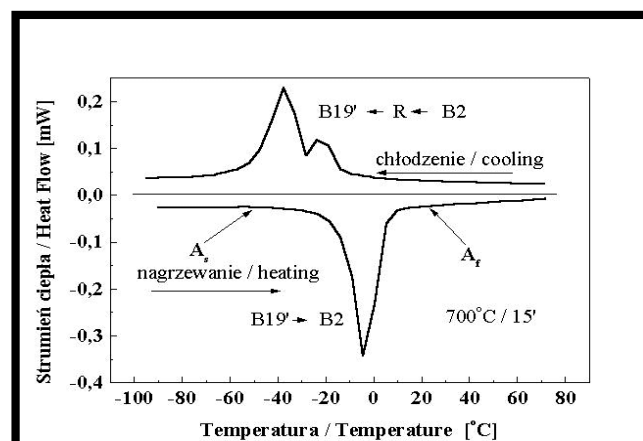
Results and discussion

We assumed that the application of internal shape memory staples should allow for a stable osteosynthesis of some fractures. Internal fixation makes it possible to start an early rehabilitation and limit the side-effects of "the post-fractural disease" i.e. swellings, venous thrombosis, muscular atrophy, decalcification of the skeletal system and articular contractions. Bone implants used so far fulfill these conditions, however in some selected cases memory shape implants can improve fixation, diminish surgical invasiveness and facilitate the operation.

Many fractures are accompanied by the damage of the sites where periarticular structures such as ligaments, articular capsules and tendons conditioning articular coherence and transmission of muscular force are attached. In such cases where the size of the fragments of the damaged bone tissue inhibits the stabilization with the use of a screw, plate, Kirshner's wire even of the smallest dimensions the, introduction of shape memory staples will secure the required stability.

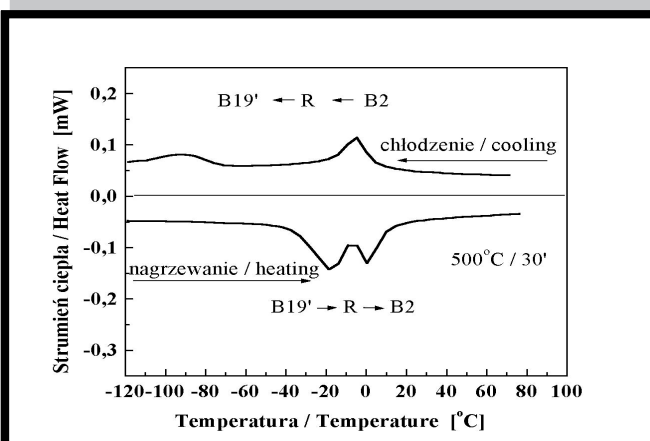
As far as fractures of upper limbs are concerned, this kind of implants can be used for fixing fractures of the larger nodule, lateral and medial epicondylus of the humeral bone, the olecranon, the styloid process of the radial bone, articular and extraarticular fractures of the metacarpal bones, intraarticular fractures of phalanx and fractures of phalanx shafts.

In the osteosynthesis of the lower limb shape memory implants can be used in the stabilization of fractures of lateral condyle of the tibia, in fractures of the head of the fibula, in fractures of shin medial and lateral bone, in fractures of calcaneal and tarsal bones, bases and distal metaphyses of other metatarsal bones, intra-articular fractures of phalanx and fractures of shafts of phalanx bones.

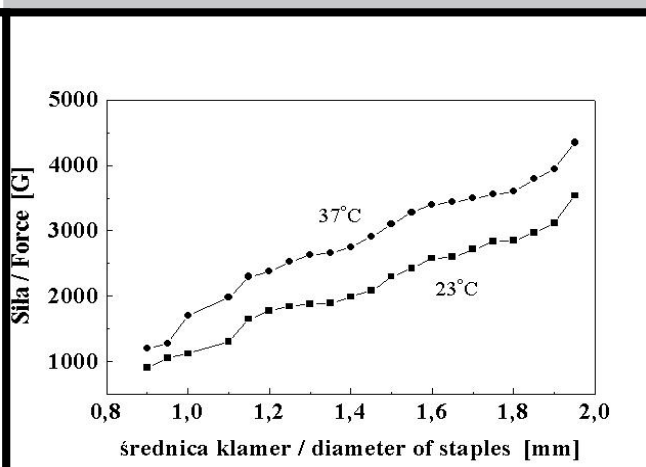
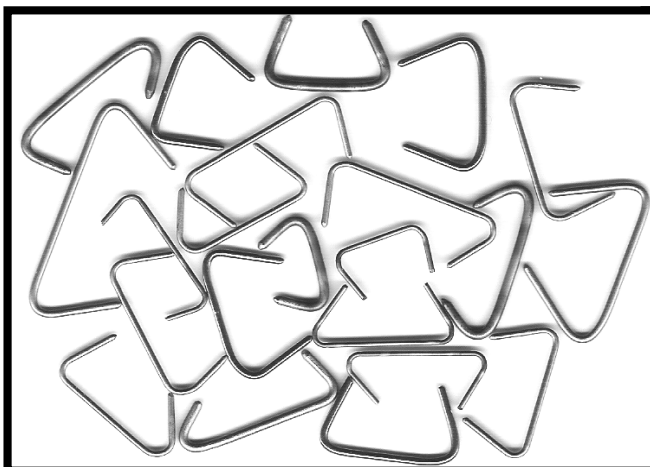


RYS. 1. Krzywe DSC drutów TiNiCo przesycanych z temperatury 700°C i wyżarzanych w 500°C w czasie 30 minut.

FIG. 1. DSC curves of the TiNiCo wires quenched from 700°C and annealed at 500°C.



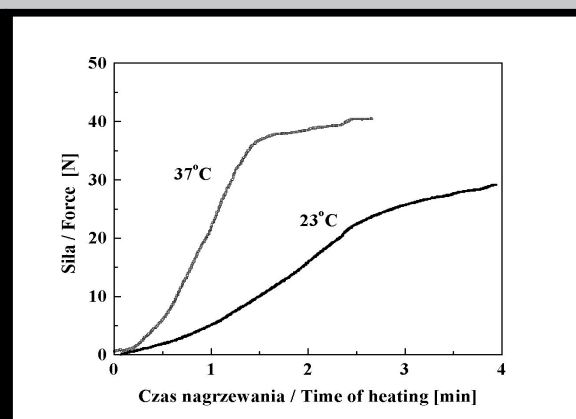
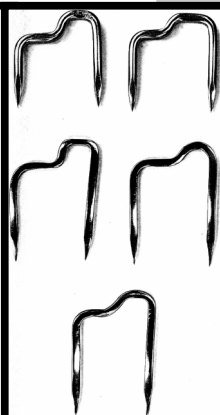
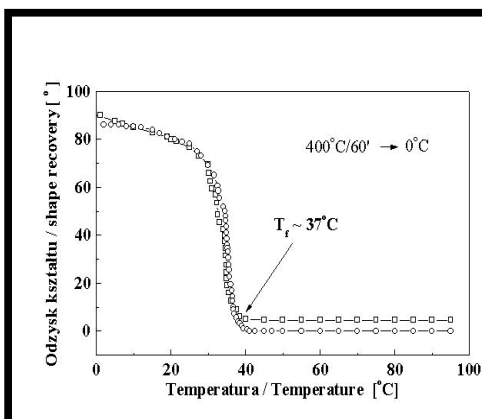
For these applications various shape memory staples have been worked out. FIG.1 shows the courses of phase transitions after heat treatment of the TiNiCo alloy used for the preparation of staples. During heating the transitions course in desired temperature range. After annealing at 500°C the separation of B19' → R and R → B2 transitions is observed.



stawowych złamań i trzonów kości paliczków. Do tych zastosowań przygotowano różne klamry z pamięcią kształtu. Na RYS.1 przedstawiono przebieg przemian fazowych w stopie TiNiCo użytym do przygotowania klamer. Przy nagrzewaniu przemiany zachodzą w pożądanym

RYS. 2. Klamry z pamięcią kształtu i siły klamer wykonanych z drutów.

FIG. 2. Shape memory staples and forces of staples prepared from wires with various diameters, recorded at room temperature and at 37°C.



zakresie temperatur. Widoczne jest rozdzielanie przemian B19' \leftrightarrow R i R \leftrightarrow B2 po wyżarzaniu w 500°C. Najprostsze klamry kompresyjne wykonane z drutów o średnicach 1 do 2 mm mają proste lub pofalowane przęsło o długości 10 do 30 mm i podgięte pod kątem 70 do 45° końcówki o długości od 7 do 15 mm. Klamry o różnych kształtach i rozmiarach mogą być dobierane dla różnych przypadków złamań. Kształty i rozmiary klamer oraz siły klamer o jednakowej długości przęsła w zależności od średnicy drutu z którego zostały uformowane przedstawiono na RYS.2. o różnych średnicach zarejestrowane w temperaturze pokojowej i w 37°C.

Szczególnego typu wszczepy pamięciowe mogą znaleźć zastosowanie w stabilizacji osteotomii kierunkowych poprawiających oś kończyny i korygujących nabyte i wrodzone deformacje w obrębie układu ruchu, jak na przykład w osteotomiach kierunkowych kolana szpotawego i koślawego lub osteotomiach korygujących płaskostopie poprzeczne z paluchem koślawym. Efekt pamięci kształtu po dobranej obróbce cieplnej, klamry oraz ich siły kompresyjne i czas nagrzewania potrzebny do osiągnięcia maksymalnej siły w temperaturze pokojowej i w 37°C przedstawiono na RYS.3. Po wyżarzaniu w 400°C drut zgięty w stanie martenzytycznym do kąta 90°, całkowicie odzyskiwał wyprostowany kształt w temperaturze około 37°C. Siła ściskająca klamry odzyskującej kształt w tej temperaturze po dwóch minutach osiąga wartość około 40 N.

Wnioski

· Klamry z badanego stopu TiNiCo odzyskują kształt pod

RYS. 3. Klamry z pamięcią kształtu do stabilizacji osteotomii kości piszczelowej, temperatury odzysku kształtu i zmiany sił podczas nagrzewania.

FIG. 3. Shape memory staples for fixation osteotomy of tibia, their temperature of shape recovery and changes of forces during heating.

The simplest compression staples made from wires with the diameter from 1 to 2 mm have straight or corrugated span which is 10 to 30 mm long and has straight legs of 7 to 15 mm in length which are slightly bent at the angle of 70 to 45°. Staples of different shapes and sizes which can be selected for different types of fractures and the forces of staples with identical length of span prepared from wires with various diameters are shown in FIG. 2.

Shape memory implants of special type can be used in the stabilization of directional osteotomies aimed at the correction of the limb's axis as well as acquired and congenital deformations within the moving system, for example in directional osteotomies of the genu varum and genu valgum or osteotomies correcting transverse platypodia with hallux valgus. Shape memory effect, the staples and their compression forces and heating time needed to obtain maximum force at room temperature and at 37°C are shown at FIG.3. After annealing at 400°C, the wire bent to 90° in the martensitic state, fully recovered the straight shape at about 37°C. At this temperature the compression force of the staple reaches, after two minutes, the value of about 40N.

wpływem ciepła ciała można wykonać z drutów wyżarzanych w zakresie temperatur 400-500°C w czasie 30-60 minut.

· Z drutów o małych średnicach można wykonać implanty o różnych kształtach i rozmiarach wywierające pożądane siły potrzebne do wewnętrznej stabilizacji różnych złamań w układzie kostnym narządów ruchu.

· Klamry z pamięcią kształtu o większych rozmiarach można wykorzystać do wewnętrznej stabilizacji osteotomii kierunkowych.

Piśmiennictwo

[1] Y. Chu., Orthopaedic applications of NiTi shape memory alloys in China. Proceedings of the International Conference on Shape Memory and Superelastic Technologies, California, (2000) 619-628.

[2] R. G. Tang, K. R. Dai, J. Q. Chen., Application of a NiTi staple in the metatarsal osteotomy. Bio-Medical Materials and Engineering 6 (1996) 307-312.

[3] J. Musialek, P. Filip, J. Nieslanik., Titanium-nickel shape memory clamps in small bone surgery. Arch. Orthop. Trauma Surg. 117 (1998) 341-344.

[4] K. Dai, Y. Chu., Studies and applications of NiTi shape memory alloys in the medical field in China. Bio-Medical Materials and Engineering 6 (1996) 233-240.

Conclusions

· Staples made of the tested TiNiCo alloy that regain shape being influenced by the body heat can be produced from the wire annealed in the temperature ranging from 400 to 500°C for 30-60 minutes.

· Wire of small diameter can be used for making implants of different shapes and sizes that exert required forces needed for internal stabilization of different fractures in the skeletal system of the motor organs.

· Shape memory staples of some size can be use for internal stabilization of directional osteotomies.

References

[5] W. Y. Ip, C. H. Cheng, S. Cheung, P. H. Ho., Potential use of NiTi implant for intra-articular fracture of phalanx. European Cells and Materials, vol. 1 (2001) 63.

[6] Y. Chu, K. Dai, M. Zhu, X. Mi., Medical Application of NiTi Shape Memory Alloy in China. Proceedings of the International Symposium on Shape Memory Materials held in Kanazawa, Japan (1999). Materials Science Forum 327-328 (2000) 55-62.

[7] J. Drugacz, Z. Lekston, H. Morawiec, K. Januszewski., Use of TiNiCo shape memory clamps in the surgical treatment of mandibular fractures. J. Oral Maxillofacial Surgery, 53 (1995) 665-701.

BIOZGODNE POWŁOKI TiN NA POLIURETANIE; MIKRO-STRUKTURA I WŁAŚCIWOŚCI

R.MAJOR*, E.CZARNOWSKA**, R.KUSTOSZ**, J.M.LACKNER****, W.WALDHAUSER*****, P.LACKI*****, B.MAJOR*

*INSTYTUT METALURGII I INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ POLSKA AKADEMIA NAUK W KRAKOWIE, KRAKÓW, POLSKA
NMMAJOR@IMIM-PAN.KRAKOW.PL

**INSTYTUT MATKI I DZIECKA, ODDZIAŁ PATOLOGII, WARSZAWA, POLSKA

***FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII, ZABRZE, POLSKA

****JOANNEUM RESEARCH FORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH, LASER CENTER LEOBEN, AUSTRIA

*****POLITECHNIKA CZĘSTOCHOWSKA, CZĘSTOCHOWA, POLSKA

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),163-167]

Wstęp

Poliuretan stosowany jest klinicznie między innymi jako materiał kontaktujący się z krwią [1,2]. Nie ma jednak polimeru obojętnego na działanie czynników chemicznych i mechanicznych organizmu ludzkiego. Większość polimerowych biomateriałów degraduje, ponieważ czynniki organizmu ludzkiego atakują biomateriały w sposób bezpośredni lub poprzez interwencję czynników zewnętrznych. Niezbędna jest zatem zmodyfikacja warstwy wierzchniej biomateriału poliuretanowego w celu oddzielenia go od środowiska tkanek. Azotek tytanu (TiN) jest rozważany jako potencjalny materiał do kontaktu z krwią. Celem pracy było naniesienie azotku tytanu o bardzo dobrych właściwościach mechanicznych i biologicznych na podłoże poliuretanowe [3, 4] i przeprowadzenie kompleksowej diagnostyki struktural-

BIOCOMPATIBLE TiN COATINGS ON POLYURETHANE; MICRO-STRUCTURE AND PROPERTIES

R.MAJOR*, E.CZARNOWSKA**, R.KUSTOSZ**, J.M.LACKNER****, W.WALDHAUSER*****, P.LACKI*****, B.MAJOR*

*POLISH ACADEMY OF SCIENCES, INSTITUTE OF METALLURGY AND MATERIALS SCIENCES, CRACOW, POLAND,
NMMAJOR@IMIM-PAN.KRAKOW.PL

**THE CHILDREN MEMORIAL HEALTH INSTITUTE, DEPARTMENT OF PATHOLOGY, WARSAW, POLAND

***FOUNDATION OF CARDIAC SURGERY DEVELOPMENT, ZABRZE, POLAND

****JOANNEUM RESEARCH FORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH, LASER CENTER LEOBEN, AUSTRIA

*****CZESTOCHOWA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, CZESTOCHOWA, POLAND

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),163-167]

Introduction

Polyurethane is in clinical use as a blood contacting material [1,2]. No polymer is totally impervious to the chemical process and mechanical action of the body. Generally, polymeric biomaterials degrade, because body constituents attack the biomaterials directly or through other device components, sometimes with the intervention of external factors. Thus it was necessary to modify the surface to separate PU from body fluids. Titanium nitride (TiN) is regarded as a potential biomaterial for blood-contact applications, thus, the aim of the work was to deposit TiN on PU [3,4].

Część doświadczalna

Materiał i metoda badań

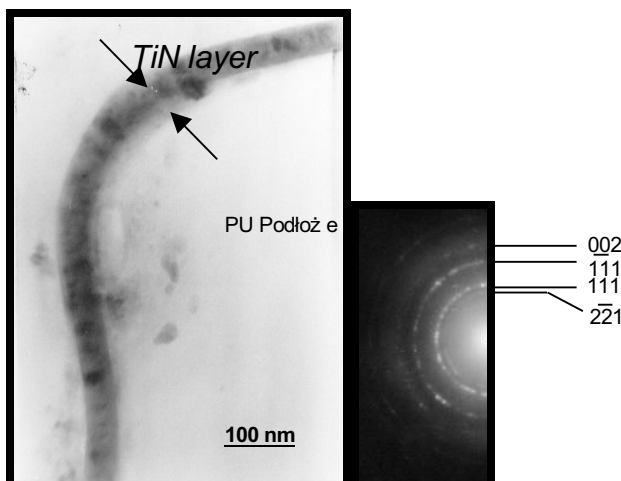
Cienkie warstwy na podłożu polimerowym zostały wytworzone wykorzystując ablację z tarcz uzyskanych metodą metalurgiczną z czystego tytanu, przy zastosowaniu lasera Nd-YAG (1064nm, czas impulsu 10ns) pracującego w Centrum Laserowym w Leoben w Austrii.

Badania strukturalne zrealizowano wykorzystując elektronową mikroskopię transmisyjną (TEM) oraz mikroskopię sił atomowych (AFM). Analizę fazową i pomiary naprężeń własnych wykonano za pomocą dyfraktometru rentgenowskiego (Philips PW 1710) sterowanego programem APD. Przeprowadzono badania tekstury metodą konwencjonalną oraz wykorzystując metodę tomografii teksturalnej. Oceniono rozkład naprężeń własnych na powierzchni przez zastosowanie detektora pozycyjnie czułego. Obserwacje komórek adhezujących, w badaniach biologicznych, wykonano za pomocą konfokalnego mikroskopu (Olympus, FV-500 system).

Wyniki i dyskusja

Tekstura krystalograficzna

Analizując teksturę krystalograficzną cienkich warstw niezbędne jest określenie orientacji na stałej głębokości wnikania, co przeprowadzono metodą tomografii tekstury. Metoda jest nieniszcząca pozwalająca na diagnostykę obszarów przypowierzchniowych. Ustalenie figury biegunowej dla stałej głębokości wnikania promieniowania rentgenowskiego może być jedynie zrealizowana gdy stały promień padania promieniowania na próbkę jest ściśle ustalony. To może być zrealizowane przy zastosowaniu goniometru z modem skanującym $\theta-2\theta$ do $\omega-2\theta$. Metodę tomografii teksturalnej (X-ray Texture Tomography XTT) zastosowano do analizy warstw grubości $3\mu\text{m}$ naniesionych na podłożu poliuretanowe. Orientacja krystalitów analizowana była do głębokości $2\mu\text{m}$ oraz $3\mu\text{m}$. Badania przy podłożu (figury biegunowe różnicowe) pozwoliły określić charakter wczesnego mechanizmu wzrostu. Stwierdzono wysoką niejednorodność, gdzie dominująca składowa na głębokości $2\mu\text{m}$



RYS. 1. Mikrostruktura TEM przekroju poprzecznego warstwy TiN na podłożu poliuretanowym wraz z dyfrakcją elektronową z warstwy.

FIG. 1. Cross section of the 50nm thick layer deposited on polyurethane substrate.

Experimental

Methods

Titanium nitride thin layers were fabricated by pulsed laser deposition with the Nd:YAG laser on biologically applied polyurethane. Transmission electron microscopy (TEM) studies considered layers 250 nm and 50 nm thickness. Finite element modeling was performed to establish the temperature distribution in the substrate and in the layer as well as a model of the crack formation. Biocompatibility examinations focused on the material contact with the human fibroblast. The fibroblasts were obtained from healthy donors. Cells from the 2-3 passage of the initial culture were moved to the surface of the investigated materials in the amount of 1.5×10^5 cells/ml.

Results and discussion

Crystallographic texture

Texture investigation of the thin films is very difficult to perform. It is necessary to apply additional rotation to the material to carry out the examination at the constant level of thickness. This process is called texture tomography (XTT, X-Ray Texture Tomography). XTT is a non-destructive method of texture analysis in the near the surface area, where the diameter is determined by the penetration depth of the applied radiation. The registration of the constant-depth pole figures can be realized only when a constant incidence angle of the beam on the sample is retained. It can only be achieved with the goniometer in the scanning mode $\theta-2\theta$ to the $\omega-2\theta$. The texture was observed to be inhomogeneous, but the dominant components for the 2 and $3\mu\text{m}$ were the same $\{112\}<011>$. In the initial stage of the deposition, TiN cluster of the $<110>$ orientation was found at the depth of $3\mu\text{m}$.

TEM microstructure

250 nm thick layers were deposited on a polyurethane substrate. Transmission electron microscopy investigation of the cross section revealed columnar character of the deposited layer. During the deposition, there are two steps of the film growth: initial, typical for the very thin layers, and late model, characteristic for thick ones. The TEM microstructure presents deformation of the substrate, because of the process influence, cracking and additional secondary nucleation after cracking, typical for ceramic coating. A precise plasma diagnosis and numerical simulation resulted in the preparation of a new layer composition. The thickness was reduced to 50 nm. It caused even the change of the layer behavior (FIG.1).

The selected area electron diffraction pattern revealed nanocrystalline character of the titanium nitride, which proves the layer distribution was uniform. The samples for the TEM investigations were prepared with the microtome. The microtome knife did not damage the layer. The TiN layer was observed to be elastic. Even strong deformation did not lead to the delamination of the film (FIG.1).

Biocompatibility

The examination focused on the biocompatibility with the human fibroblast [5]. The fibroblasts were obtained from healthy donors. Cells from the 2-3 passage of the initial culture (the cells which were unstuck by trypsin with EDTA) were moved to the surface of the investigated materials in the amount of 1.5×10^5 cells/ml in Dulbecco culture medium, consisting of 15% of serum (fetal bovine serum, from Gibco company BRL, UK) and antibiotics (penicillin and streptomycin, of the SIGMA company, UK). When the cell culture was completed, the incubation liquids were gathered and frozen in temp. -70°C . Then, the samples were washed 3 times in buffered physiological salt (of the SIGMA company, UK), the adhered cells on the samples were fixed

(1 μm powyżej warstwy) jak i 3 μm (tuż przy warstwie) była {112}<011> ale rozwinięta w różnym zakresie. Dodatkowo stwierdzono formowanie się charakterystycznego klasteru o orientacji <110> w początkowym zakresie wzrostu warstwy (na głębokości 3 μm).

Mikrostruktura TEM

Jako warstwę reprezentatywną dla warstw grubych wybrano grubość 0.25 mm; o połowę mniejszą od najcieńszej do tej pory rozpatrywanych i badanych transmisyjną mikroskopią elektronową (TEM). Cienkie folie z przekroju poprzecznego TiN 0.25 mm na poliuretanie przygotowano za pomocą ultramikrotomu. Badania za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazały powstawanie deformacji podłoża podczas osadzania, pękanie warstwy lub jej mostkowanie oraz wtórne zarodkowanie wzrostu warstwy po pęknięciu. Powstawanie charakterystycznych kolumn dowodzi formowania się warstw późnym mechanizmem wzrostu, kolumnowym. Zmniejszenie grubości osadzanego azotku tytanu spowodowało przejście do wczesnego mechanizmu wzrostu (z mechanizmu kolumnowego do 2D lub 2D+3D). Spowodowało to zmianę właściwości warstwy. Stwierdzono, iż pomimo materiału ceramicznego, obserwuje się elastyczne odkształcenie powłoki i jej wysoką adhezję (RYS.1).

Na podstawie dyfrakcji elektronowej (selected area electron diffraction pattern) wykazano nanokrystaliczny charakter warstwy TiN.

Biozgodność

Badano biologię ludzkich fibroblastów uzyskanych ze skóry zdrowych dawców [5]. Komórki z 2-3 pasaży hodowli pierwotnej (komórki odklejane trypsyną z EDTA), przenoszono na badane materiały w ilości 1.5×10^5 komórek/ml w medium hodowlanym Dulbecco zawierającym 15% surowicy i antybiotyki (penicylina i streptomycyna).

Po zakończonej hodowli płyny inkubacyjne zbierano i zamrażano w temp. -70°C , następnie próbki przemywano 3x solą fizjologiczną buforowaną, komórki przylegające utrwalano 4% paraformaldehydem i 70% metanolem. Utrwalone komórki przemywano 0,5% surowicą (BSA), a następnie znakowano za pomocą pierwotnego przeciwciała (mouse anti-human CD49E; receptor dla fibronektyny) lub anti-FN (fibronektyna, firmy Chemicon) oraz wtórnego przeciwciała Alexa Fluor 488 (chicken anti-mouse IgG) i barwiono 7-amino-actinomycyną (7AAD). Próbki z wybarwionymi komórkami naklejono na szkiełka podstawowe i zamykano w medium do badań fluorescencyjnych. Preparaty analizowano w konfokalnym mikroskopie laserowym (Olympus FV-500 system) i w laserowym cytometrze skaningowym, gdzie źródłem światła są lasery. W płynach inkubacyjnych z hodowlanych komórek oznaczano metodą immunoenzymatyczną (ELISA) zawartość interleukiny -1β (IL- 1β).

Uzyskane wyniki dla danego biomateriału uśredniano i wyliczano błąd standardowy średniej. Kontrolę stanowiły badania komórek inkubowanych w komorach hodowlanych Lab-Tek (Nunc).

Adhezja komórek

Komórki przylegające do badanych materiałów oceniano w laserowym mikroskopie skaningowym. Najwięcej fibroblastów po 48 godzinach inkubacji przylegało do próbek poliuretanowych z warstwą tytanu. Uzyskane obrazy komórek przylegających na badanych próbkach biomateriałów i na szkle przedstawiono na RYS.2.

Ekspresja receptora w błonie komórkowej fibroblastów dla fibronektyny

Zakotwiczenie komórek w macierzy pozakomórkowej następuje poprzez połączenie receptora znajdującego się w błonie komórkowej z odpowiednim dla niego białkiem obecnym z macierzy pozakomórkowej lub biofilmie. Receptor fibronektyny (CD49e) łączy się z białkiem zw. fibronektyną,

by 4% paraformaldehyd i 70% metanol. Fixed cells were washed with 0.5% serum (BSA of the ATTC company, USA) and marked by the primary antibody mouse anti-human CD49E or anti-FN and secondary antibody Alexa Fluor 488 chicken anti-mouse IgG, and colored by 7-amino-actinomycin (7AAD). The samples with the colored cells were glued onto the base glass and closed in the medium for the fluorescence investigations. The specimens were analyzed in laser confocal microscopy (Olympus FV-500) and in laser scanning cytometer (ComuCyte). In the incubation fluids from the cell cultivation the amount of interleukine -1β (IL- 1β) was marked by immunoensimatic method (ELISA). The incubative media or the reference was put onto the microtitrative plates covered by antibody (anti-human) IL- 1β , incubated in 4°C . Further they were incubated with the secondary antibody of the goat IL- 1β . The appeared complexes were detached by streptavidyna associated with horseradish peroxidase. Colored reaction was caused by hydrochloride of o-fenylodiamin (OPD). The absorption was checked on the automatical reader of the microplates (Single-channel reader- assay system, type ELX 800; BIO-TEK INSTRUMENTS, INC, USA), with the wave length 492nm. The obtained results for the specific biomaterial were averaging and the accuracy was calculated. As a reference there were the cells incubated in the cultivation chambers Lab-Tek (Nunc). Biological examinations were performed on human fibroblast cells in 48 hours culture. Samples of each type of biomaterial were investigated with the same population of cells and analysed under light and confocal microscope. For light microscopical analysis the cells were harvested from the samples by nonenzymatic chemical Cell Dissociation Solution (Sigma), then analysed with trypan blue staining and counted using a Burcker's camera. For confocal microscopical investigations the cells adhered to the substrates were fixed in 4% paraformaldehyde followed by ice-cold 70% methanol, then cell nuclei were visualised by incubation with 7-aminoactinomycin D (Merck) and finally were imaged by confocal microscope (Olympus, FV-500 system).

Cell adhesion

The data show that the number of fibroblasts (FIG.2) adhering to polyurethane with a TiN layer was lower than on polyurethane with a Ti layer and the control substrate.

Receptor expression in the cell membrane of a fibroblast for fibronectine

Cells are anchored in the extra-cellular matrix through the receptor present in the cell membrane with the appropriate protein which is in the extra-cellular matrix or in the biofilm. The fibronectine receptor (CD49e) connects with the protein called fibronectin. Receptor expression (CD49e) was investigated in confocal microscopy in adhered fibroblasts on the investigated samples. Similar, slight expression of the receptor was observed in the cultivated cells on polyurethane covered by Ti and TiN, while the expression of the receptor cultivated on a glass substrate was well seen.

Fibronectine expression

Fibronectine is a glycoprotein which exists outside cells and on the cells surface. It exists also in blood and in other body fluids and on the surface of the cells of connective tissue. This protein associates with the other proteins of the extracellular matrix like fibrinogen, collagen, glycozaminoglicans and with suitable receptors which are in the cell membrane. The expression of the internal and external fibronectine was analyzed in confocal microscopy in fibroblasts adhering to the investigated samples. It created the net with a different structure on the investigated materials. Fibronectin on the Ti layer deposited on PU substrate created bands with dense fibers laying on the axis of the

Ekspresję receptora CD49e badano w mikroskopie konfokalnym w fibroblastach zadherowanych na badanych próbkach. Obserwowano podobną, śladową, punktową ekspresję receptora w komórkach hodowanych na poliuretanie pokrytym tytanem i TiN, podczas gdy w komórkach hodowanych na szkle jego ekspresja była wyraźnie zaznaczona.

Ekspresja fibronektyny

Fibronektyna jest glikoproteiną występującą pozakomórkowo oraz na powierzchni komórek. Występuje w krwi i innych płynach ustrojowych oraz na powierzchni komórek w tkance łącznej. Białko to łączy się z innymi białkami macierzy pozakomórkowej jak fibrynogen, kolagen, glikozaminoglikany oraz z odpowiednimi receptorami znajdującymi się w błonie komórkowej. Ekspresję fibronektyny, zarówno wewnątrzkomórkowej jak i pozakomórkowej analizowano w mikroskopie konfokalnym w fibroblastach przylegających do próbek. Tworzyła ona na badanych materiałach sieć o różnej strukturze. Fibronektyna na tytanie pokrywanym poliuretan tworzyła pasma gęstych włókien o przebiegu zgodnym z osią przylegających komórek, a na TiN pokrywanym poliuretan - sieć z oczkami o zagęszczonej strukturze, głównie wokół komórek. Na szkle - materiale kontrolnym - sieć fibronektyny tworzyła nieregularne, biegnące w różnych kierunkach połączenia.

Ekspresja winkuliny

Winkulina jest polipeptydem, który wiąże białka błony komórkowej do aktynowego cytoszkieletu części korowej cytoplazmy w miejscu powstającego połączenia komórka-macierz pozakomórkowa, a więc w miejscu formowania tzw. płytek przylegania (ang. focal contact). Stąd też jej duża ekspresja świadczy o silnym zakotwiczeniu komórek na substracie. Ekspresję winkuliny analizowano w mikroskopie konfokalnym w fibroblastach osadzonych na badanych próbkach. Większą ekspresję tego białka obserwowano w fibroblastach inkubowanych na poliuretanie pokrytym tytanem niż w komórkach rosnących na TiN wytworzonym na poliuretanie lub szkle (materiał kontrolny).

Liczba komórek żywych w populacji

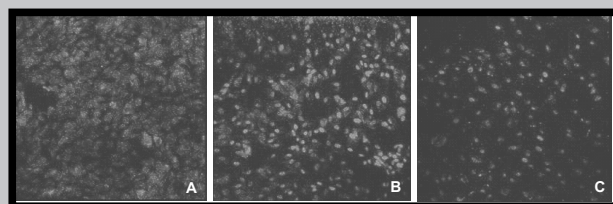
Żywołność komórek kontaktujących z biomateriałem jest jednym z podstawowych parametrów biogodności. Fibroblasty odklejone z badanych próbek po wybarwieniu barwnikiem przeżyciowym liczono w komorze Burckera. W populacjach fibroblastów rosnących na poliuretanie pokrytym tytanem lub warstwą TiN oraz w kontroli (szkło) występowały pojedyncze komórki martwe zaś ponad 99% komórek było żywych. Liczba komórek żywych na badanych biomateriałach była porównywalna.

Badania poziomu interleukiny-1 β w medium inkubacyjnym

Interleukina-1 β (IL-1 β) jest prawdopodobnie najsilniejszym immunostymulatorem odpowiedzi immunologicznej, w tym odpowiedzi na obecność obcego materiału w środowisku biologicznym lub w organizmie. Dlatego też jest, jednym z podstawowych czynników pozwalających ocenić immunogenność biomateriału. Przy niskiej biogodności biomateriału, komórki hodowane w jego obecności syntetyzują i wydzielają IL-1 β . Poziom IL-1 β oznaczano w płynach inkubacyjnych uzyskanych z 48 godzinnej hodowli fibroblastów na tytanie i TiN wytworzonych na poliuretanie. Badanie nie wykazało obecności IL-1 β w zebranych płynach.

Wnioski

Celem pracy było zaproponowanie nowego materiału biogodnego. Pierwszą propozycją było naniesienie warstwy o grubości 250nm, ale ze względu na budowę krystaliczną, charakteryzowała się ona znaczną kruchością. Na



RYS. 2. Jądra komórkowe fibroblastów przylegających do badanych materiałów widoczne w skaningowym mikroskopie laserowym (LSC). A-szkło, B- Tytan na poliuretanie, C-TiN na poliuretanie. Powiększenie mikroskopowe x20.

FIG. 2. Fibroblast proliferation on control culture dish substrate (A), on the polyurethane with Ti layer (B), and polyurethane with TiN layer (C).

adhered cells. In the TiN layer, a net with "dots" were formed with dense structure, mainly around the cells. On the control material-glass, the net of the fibronectin created irregular connections which were situated in different directions.

Winculin expression

Winculin is a polypeptid, which connects the proteins of the cell membrane with the active cytoskeleton of the cytoplasm cortex at the connection point between a cell and the extracellular matrix, i.e. in the place where the so-called adhesive plates are formed (focal contact). Thus, its huge expression provides strong anchoring of the cells in the substrate. The winculin expression was analyzed in confocal microscopy in the adhering fibroblasts on the investigated samples. Bigger expression of this protein was observed on Ti on PU then on TiN on PU or glass (control material).

The level of interleukin-1 β in the incubation medium

Interleukin-1 β (IL-1 β) is probably the strongest immunostimulator of the immunological "answer", including the "answer" for the strange material in the biological environment or in the organism. Thus, it is one of the basic factors, which allows to examine immunogenicity of a biomaterial. When the biocompatibility of the biomaterial is low, the cultivated cells synthesise and evolve IL-1 β . The level of IL-1 β was marked in the incubative liquids gained from 48 hours fibroblast proliferation (cultivation) on Ti and TiN deposited on polyurethane. The investigation did not show the presence of IL-1 β in the liquid gathered from the surface.

Conclusions

The aim of the work was to invent a new biocompatible material. The first examined layer was 250nm thick, but it turned out to be fragile. On the basis of the gained experience, the thickness was reduced and deposition conditions were improved. 50nm thick layers were observed to be elastic.

The performed investigations of biocompatibility show, that the probability of the cell adhesion to a Ti layer is higher than to the TiN on PU. It is proved by the number of the adhering cells and the high expression of winculin. Lack of IL-1 β in the incubated liquids proves high biocompatibility of Ti and TiN layers. It seems that TiN surface layer produced on polyurethane presents good biocompatibility and decreased surface affinity for cell adhesion, which is expected in blood applications.

podstawie uzyskanych doświadczeń i obliczeń numerycznych, zredukowano grubość do 50nm. Taka kompozycja warstwy wykazywała właściwości elastyczne.

Przeprowadzone testy biogodności wykazały, że prawdopodobieństwo przylegania komórek do podłoża wzorcowego i podłoża z naniesioną warstwą Ti jest większe niż dla podłoża z warstwą TiN, co zostało potwierdzone ilością komórek przylegających oraz wysoką ekspresją winkuliny. Brak IL-1 β w płynach inkubowanych dowodzi wysokiej biogodności warstw Ti i TiN. Wydaje się, że warstwa TiN naniesiona na poliuretan posiada wysoką biogodność i obniżone powinowactwo do podłoża dla adhezji komórek. Taka właściwość materiału jest w zastosowaniu materiału do kontaktu z krwią korzystna.

Podziękowania

Praca finansowana w ramach projektu badawczego PBZ-KBN-082/T08/2002/ oraz PBZ-KBN-100/T08/2003 ze środków Polskiego Ministerstwa Nauki i Informatyzacji.

HYBRYDOWE MEMBRANY I GĄBKI CHITOZANOWE JAKO OPATRUNKI

Z. MODRZEJEWSKA*, H. STOBİŃSKA**

POLITECHNIKA ŁÓDZKA,
90-924 ŁÓDŹ UL. WÓLCZAŃSKA 213

*WYDZIAŁ INŻYNIERII PROCESOWEJ I OCHRONY ŚRODOWISKA
ZMODRZEJ@WIPOS.P.LODZ.PL

**INSTYTUT TECHNOLOGII FERMENTACJI I MIKROBIOLOGII

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),167-169]

Leczenie ran przewlekłych, a zwłaszcza zakażonych i obejmujących duże powierzchnie ciała stanowi nadal poważny problem. Klasyczne metody, w tym koncepcja leczenia ran w środowisku wilgotnym nie zapewniają skutecznego efektu terapeutycznego, zwłaszcza w przypadku ran zakażonych. W tym przypadku wymagane jest skojarzone działanie opatrunku i środka bakteriobójczego. Miejscowa antybiotykoterapia jest metodą mającą na celu zapewnienie właściwego stężenia leku i zwalczania infekcji w miejscu chorobowo zmienionym. Prowadzi to do ograniczenia działania ogólnoustrojowego antybiotyku i do zmniejszenia jego objawów ubocznych. Skuteczność tej metody jest uwarunkowana doborem odpowiedniego nietoksycznego, biogodnego i biodegradowalnego nośnika antybiotyku. Analiza literatury wskazuje, że jednym z bardziej interesujących polimerów może być chitozan. Chitozan jako materiał opatrunkowy jest szeroko badany. Z prezentowanych badań na zwierzętach wiadomo, że chitozan przyspiesza gojenie ran poprzez: zwiększenie napływu do miejsca zakażenia komórek fagocytujących (granulocyty segmentowane i makrofagi), stymulację migracji i proliferacji komórek naczyń śródbłonna i fibroblastów, a według niektórych autorów również keratynocytów.

W pracy przedstawiono sposób wytwarzania hybrydowych membran i gąbek chitozanowych zawierających w struktu-

Acknowledgement

167

The work was supported by the State Committee for Scientific Research of Poland under Project: PBZ-KBN-082/T08/2002/ and PBZ-KBN-100/T08/2003 project from the means provided by the Polish Ministry of Science and Informatization.

Piśmiennictwo References

- [1] D. Rather, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons Biomaterials Science; An Introduction to Materials in Medicine 2nd edition; Edited by Byddy 2004, Elsevier Inc.
- [2] Schedermayer, D. L., and Shaporo, R. S.. The artificial heart as a bridge to transplant: ethical and legal issues at the bedside. J. Heart Transplant 8: (1989) 471-473.
- [3] B. Major, W. Mróz, T. Wierchoń, W. Waldhauser, J. M. Lackner, R. Ebner, Pulsed laser deposition of advanced titanium nitride thin layers, Surf. Coat. Technol.180-181, (2004), 580-584.
- [4] Bäuerle D., Laser processing and Chemistry, Third Edition, Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, 2000, Printed in Germany.
- [5] Roman Major, Elżbieta Czarnowska, Agnieszka Sowińska, Roman Kustosz, Juergen M. Lackner, Wolfgang Waldhauser, Michal Woźniak, Tadeusz Wierchoń, Bogusław Major; Structure and biocompatibility of titanium nitride coatings on polyurethane produced by laser ablation e-Polymers 2005, no. 026.

CHITOSAN HYBRID MEMBRANES AND SPONGES AS WOUND DRESSINGS

Z. MODRZEJEWSKA*, H. STOBİŃSKA**

TECHNICAL UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,
90-924 ŁÓDŹ, WÓLCZAŃSKA 175, POLAND

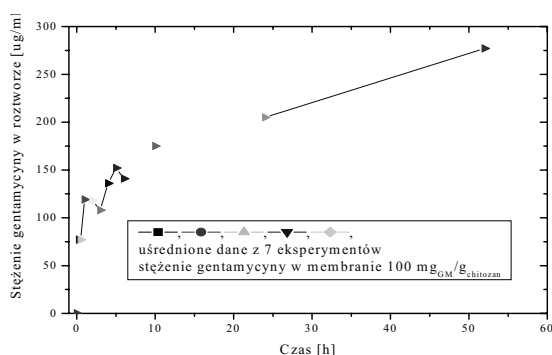
*FACULTY OF PROCESS AND ENVIRONMENTAL ENGINEERING
ZMODRZEJ@WIPOS.P.LODZ.PL

**INSTITUTE OF FERMENTATION TECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),167-169]

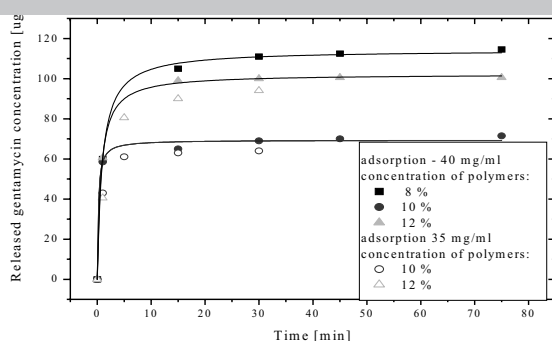
Treatment of long-lasting wounds, especially infected ones and covering big body surfaces, is still a serious problem. Traditional methods, including wound treatment in a humid environment, do not ensure good therapeutic effect, particularly for infected wounds. In this case, a coupled action of the dressing and bactericidal agent is required. Local antibiotic treatment is a method whose aim is to provide a proper concentration of a therapeutic agent and to control infection in morbid changes. This leads to restriction of the systemic action of an antibiotic and to decrease of its side effects. Efficiency of this method is determined by the choice of a proper non-toxic, biocompatible and biodegradable antibiotic carrier. Analysis of the literature shows that chitosan is one of the most interesting polymers that can be used for this purpose. Chitosan as a dressing material has been examined extensively. From researches carried out on animals it is known that chitosan enhances wound healing by increasing the inflow of phagocytic cells (segmented granulocytes and macrophages) to the infection site, stimulating the migration and proliferation of cells in endothelium vessels and fibroblasts, and also keratinocytes.

The authors present a method for the formation of chitosan hybrid membranes and sponges containing gentamycin in their structure. The membranes were formed from chitosan of molecular weight 500 kD by the phase inversion method,



RYS. 1a. Uwalnianie gentamycyny wprowadzonej do struktury - koagulacja NaOH.

FIG. 1a. Release of gentamycin introduced to the structure - NaOH coagulation.



RYS. 1b. Uwalnianie zaadsorbowanej gentamycyny.

FIG. 1b. Release of adsorbed gentamycin.

rze gentamycynę. Membrany wytwarzano metodą inwersji z chitozanu o masie cząsteczkowej 500 kD, przy zastosowaniu jako rozpuszczalnika kwasu octowego. Koagulację prowadzono do wodnych roztworów NaOH. Gentamycynę, w ilości 100 mg/g chitozanu wprowadzano do membrany w czasie jej formowania, dodając antybiotyk do roztworu błonotwórczego oraz po uformowaniu - drogą adsorpcji. Chitozanowe gąbki wytwarzano bez koagulacji - do formowania wysokoporowatych struktur zastosowano kwaśny węgiel sodu. NaHCO_3 posiada słabo zasadowy charakter, a przy jego rozkładzie uwalnia się ditlenek węgla. Wprowadzony zatem w odpowiedniej proporcji do roztworu neutralizuje go i powoduje wytrącenie polimeru, a uwalniany CO_2 formuje wysokoporowatą strukturę. Gąbki wytwarzano z 10% roztworów chlorku chitozanu. Gentamycynę dodawano w ilości 125 mg/g, NaHCO_3 w ilości nie powodującej pienienia oraz powodującej spienienie: 20-100% w stosunku do polimeru.

Uwalnianie antybiotyku

Przydatność membran chitozanowo-gentamycynowych oraz gąbek jako opatrunków o kontrolowanym uwalnianiu antybiotyku określano na podstawie szybkości uwalniania gentamycyny oraz badania wpływu tych błon na wzrost kolonii bakteryjnych. Uwalnianie prowadzono do buforu o $\text{pH}=7$. Wyniki przedstawiono na RYS. 1a i b oraz 2.

Badanie działania bakteriobójczego błon chitozanowo-gentamycynowych

Właściwości bakteriobójcze błon chitozanowo-gentamycynowych oceniano w stosunku do testowych gatunków bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, które pochodziły z Kolekcji

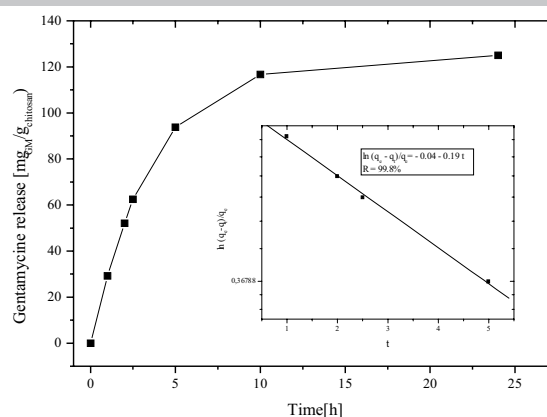
using acetic acid as a solvent. Coagulation was carried out to water solutions of NaOH. Gentamycin, in the amount of 100 mg/g chitosan was introduced to the membrane while forming it; the antibiotic was added to the membrane-forming solution and after it had been formed - by means of adsorption. The chitosan sponges were formed by the process without coagulation - sodium bicarbonate was used to form super porous structures. NaHCO_3 has a slightly basic character, and during its decomposition carbon dioxide is released. When introduced in a proper amount to the solution, sodium bicarbonate neutralises it and causes a polymer precipitation; the released CO_2 forms a super porous structure. Sponges were formed from 10% chitosan chloride solution. Gentamycin was added in the amount of 125 mg/g and NaHCO_3 in the amount that did not and did provoke foaming: 20-100% in relation to the polymer.

Antibiotic release

Suitability of chitosan-gentamycin membranes and sponges as wound dressings of controlled antibiotic release was determined on the basis of gentamycin release rate and examination of the effects of these membranes on the growth of bacterial colonies. The antibiotic was released to a buffer of $\text{pH}=7$. Results are shown in FIGURES 1a and b, and in FIGURE 2.

Examination of the bactericidal action of chitosan-gentamycin membranes

Bactericidal properties of the chitosan-gentamycin membranes were assessed on test bacterial species of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 coming from the ŁOCK 105 Collection of the Institute of Fermentation Technology and Microbiology, Lodz Technical University. A suspension of the above mentioned bacteria of the density 10^8 cells in 1 cm^3 was prepared in the physiological sodium chloride solution. One cm^3 of this suspension was added to 100 cm^3 Mueller-Hinton agar nutrient and plated in the amount of 15 cm^3 on Petri dishes. Afterwards, $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ membrane samples were placed on the nutrient surface. After incubation at the temperature 37°C for 16-24h, bactericidal action of the tested membranes was assessed basing on the criteria described by SN 195921 and SN 195922 standards, i.e. with reference to: - the presence and dimensions of the zone inhibiting growth



RYS. 2. Uwalnianie gentamycyny wprowadzonej do struktury (przy współdziale NaHCO_3).

FIG. 2. Release of gentamycin introduced to the structure (in the presence of NaHCO_3).

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Blona z chitozanu Chitosan membrane	0	0	0
Blona z chitozanu + gentamycyna w strukturze Chitosan membrane + gentamycin included	8	11	-
Blona z chitozanu + gentamycyna w strukturze po 48 h desorpcji Chitosan membrane + gentamycin included after 48 h desorption	-	0	-
Blona z chitozanu + gentamycyna po adsorpcji Chitosan membrane + gentamycin after adsorption	20	14	15
Blona z chitozanu + gentamycyna po adsorpcji po 48 h desorpcji Chitosan membrane + gentamycin after adsorption followed by 48 h desorption	10,5	2	3,5
Gąbka z chitozanu Chitosan sponge	8	1	0
Gąbka z chitozanu + gentamycyna Chitosan sponge + gentamycin	12,5	11	8

ŁOCK 105 Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej. Zawiesinę w/w bakterii o gęstości 10^8 komórek w 1cm^3 przygotowano w roztworze fizjologicznym chlorku sodu. Jeden cm^3 tej zawiesiny dodawano do 100 cm^3 agarowej pożywki Muellera-Hintona i wylewano w ilości 15cm^3 na płytki Petriego. Po czym na powierzchni pożywki umieszczano próbki błon o wymiarach $2\text{cm} \times 2\text{cm}$. Po inkubacji w temperaturze 37°C w czasie 16-24h oceniano działanie bakteriobójcze badanych błon w oparciu o kryteria zawarte w opisie norm SN 195921 i SN 195922, tj. na podstawie:

- obecności i rozmiaru strefy hamującej wzrost testowanych bakterii wokół badanej błony

- wzrostu bakterii lub jego braku w strefie kontaktu błony z pożywką hodowlaną.

Antybakteryjne działanie różnych form chitozanu na wybrane szczepy przedstawiono w TABELI 1.

Membrany i gąbki chitozanowo-gentamycynowe wykazują silne działanie bakteriobójcze w stosunku do *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, a także *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteriostatyczne działanie obserwuje się także dla chitozanu uformowanego w postaci hydrożelowej membrany oraz gąbki. Lepszą aktywność wykazują gąbki chitozanowe. Chitozan w połączeniu z gentamycyną tworzą struktury charakteryzujące się trwałym działaniem bakteriobójczym. Prezentowane zatem membrany i gąbki stanowią mogą dobry materiał opatrunkowy na rany zakażone.

TABELA 1. Strefy hamowania wzrostu badanych szczepów bakterii.

TABLE 1. Zones of growth inhibition of tested bacterial strains.

of the tested bacteria around the membrane,

- the presence or absence of bacterial growth in the zone of membrane contact with a culture medium.

Antibacterial action of different chitosan forms on selected strains is given in TABLE 1.

The chitosan-gentamycin membranes and sponges reveal strong bactericidal action against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and also *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriostatic action is also reported in the case of chitosan formed into hydrogel membranes and sponges. Better activity have chitosan sponges. Chitosan combined with gentamycin forms structures that are characterised by durable bactericidal action. Hence, the presented membranes and sponges can form a good dressing material to be applied on infected wounds.

ZASTOSOWANIE TECHNIKI MIKROSKOPOWEJ W OBRAZOWANIU I LECZENIU WCZESNEJ ZMIANY PRÓCHNICOWEJ

D. PIESIAK-PAŃCZYSZYN, A. CZAJCZYŃSKA, U. KACZMAREK

AKADEMIA MEDYCZNA WE WROCŁAWIU
KATEDRA I ZAKŁAD STOMATOLOGII ZACHOWAWCZEJ I DZIECIĘCEJ

Streszczenie

Próchnica tkanek twardych zębów jest chorobą infekcyjną wywołaną przez kilka jednocześnie działających czynników, tj. bakterie kwasotwórcze, ulegające fermentacji węglowodany, podatność tkanek oraz czas działania tych czynników. Wczesna zmiana próchnicowa jest jedyną odwracalną postacią tej choroby. Celem badania było określenie zmian strukturalnych

APPLICATION OF MICROSCOPE TECHNIQUE IN REPRESENTATION AND TREATMENT OF EARLY CARIES LESION

D. PIESIAK-PAŃCZYSZYN, A. CZAJCZYŃSKA, U. KACZMAREK

DEPARTMENT OF CONSERVATIVE AND PEDIATRIC DENTISTRY,
WROCLAW MEDICAL UNIVERSITY.
50-425 WROCLAW, KRAKOWSKA STREET 26

Abstract

Dental carious lesion is determined as an infectious disease caused by several factors acting concurrently i.e. bacterial factors, carbohydrates undergoing fermentation, tooth susceptibility and reaction time of these factors. Early carious lesion is the only reversible form of disease. The aim of the study is to determine the structural changes characteristic to early stages of caries appearing within enamel in compari-

charakterystycznych dla wczesnych zmian próchnicowych zachodzących w obrębie szkliwa w porównaniu ze szkliwem zdrowym oraz próba opracowania optymalnej metody ich leczenia.

Materiał doświadczalny stanowiły ludzkie zęby usunięte z powodów ortodontycznych, zdrowe oraz z początkową zmianą próchnicową. Badania nad strukturą i składem chemicznym wczesnych zmian próchnicowych zostały przeprowadzone z wykorzystaniem skaningowego mikroskopu elektronowego - Joel JSM 5800 LV. Badania mające na celu optymalizację postępowania leczniczego dla początkowego stadium próchnicy przeprowadzono na próbkach ludzkich zębów z wytworzoną sztucznie wczesną zmianą próchnicową, które podzielono w zależności od stosowanej metody leczniczej na 4 grupy: A, B, C i D. Zastosowane postępowanie terapeutyczne monitorowano za pomocą mikroskopu świetlnego - Olympus BX 50 połączonego z systemem komputerowej analizy obrazu - program Multiscan Base (wersja 08.98).

Zastosowanie mikroskopu elektronowego umożliwiło bardzo dokładną analizę struktury wczesnej zmiany próchnicowej, z uwidocznieniem silnie zmineralizowanej warstwy powierzchniowej oraz rozległego uszkodzenia podpowierzchniowego zwanego "body of the lesion". Znajomość budowy oraz składu chemicznego tych warstw umożliwiło podjęcie badań nad nową metody leczenia opartą na procesie remineralizacji zmiany za pomocą środków remineralizujących, poprzedzoną krótkotrwałym wytrawieniem jej powierzchni kwasem. Uzyskane rezultaty wskazują, że skuteczność takiego leczenia jest wyższa niż w przypadku metod konwencjonalnych.

Słowa kluczowe: wczesna zmiana próchnicowa, mikroskop świetlny, skaningowy mikroskop elektronowy, demineralizacja, remineralizacja

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),169-174]

Wstęp

Próchnica tkanek twardych zębów (caries dentium, dental caries) jest jednym z najczęściej badanych zagadnień współczesnej stomatologii. Pomimo szeregu odkryć zjawisko to nadal pozostaje nie do końca poznane, a procesy biochemiczne jemu towarzyszące nadal wzbudzają wiele dyskusji. Szczegółowa analiza tego procesu jest punktem wyjścia w poszukiwaniu nowych, jak najmniej inwazyjnych a jednocześnie skutecznych metod leczenia. Określana jest jako choroba infekcyjna tkanek twardych zęba (szkliwa, zębiny i cementu korzeniowego), wywołanych przez czynniki zewnątrzustrojowe, tj. drobnoustroje kwasotwórcze (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*), węglowodany ulegające fermentacji (monosacharydy: glukoza, fruktoza, dwusacharydy: sacharoza, laktoza, maltoza, polisacharydy: glukan, fruktan, mutan, skrobia), podatność (wrażliwość) zęba oraz czas działania czynników patogennych (RYS.1) [8,9,11,25]. Proces ten rozwinię się jednak tylko wtedy, kiedy zaistnieją warunki równoczesnego współdziałania ze sobą wszystkich wyżej wymienionych czynników. Powoduje to w pierwszym etapie, tzw. odwracalnym, odwapnienie tkanek, a następnie już nieodwracalny rozpad zawartych w nich substancji organicznych. Najważniejszymi czynnikami mającymi wpływ na stabilność struktury tkanek są: pH oraz koncentracja substancji mineralnych, tj. Ca, P, F przy powierzchni szkliwa, w płynie płytki nazębnej i otaczającej ślinie. Długotrwałe utrzymujący się spadek pH poniżej 5,5 powoduje rozpuszczanie hydroksyapatytów -

son with sound enamel and as a result striving for out the most optimal method of their treatment.

The experimental material consisted of human teeth extracted due to the orthodontic causes, healthy teeth and those with early carious lesion. The studies on structure and chemical composition of early carious lesion were carried out by means of using the scanning electron microscope - Joel JSM 5800 LV. The studies aiming at optimalization of treatment of early stage of caries were carried out on human teeth samples with artificially evoked early carious lesion, which were divided depending on the applied method of treatment into 4 groups: A, B, C and D. The applied therapeutical method was monitored by means of light microscope - Olympus BX 50 connected with computer system of image analysis - Multiscan Base (08.98 version).

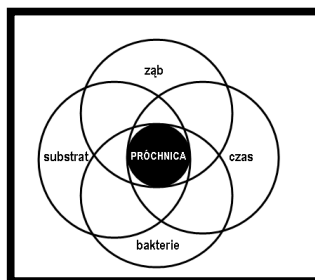
Using the electron microscope enabled very detailed analysis of early carious lesion structure showing highly mineralized surface zone and the extensive damage of sub-surface zone called body of the lesion. The knowledge of structure and chemical composition of these layers enabled starting the studies on the new method of treatment based on the lesion remineralization process by means of remineralization preparations preceded with short etching of its surface with the acid. The obtained results show that the efficiency of this treatment is much higher than in the case of conventional methods.

Key words: early caries lesion, light microscope, scanning electron microscope, demineralization, remineralization

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),169-174]

Introduction

Dental caries is one of the most frequently researched subjects in the area of contemporary dentistry. Despite numerous discoveries the phenomenon is still mysterious and the accompanying biochemical processes raise many arguments. Detailed analysis of this process is the starting point in searching new, the least invasive and at the same time the most effective methods of treatment. It is determined as an infectious disease of dental tissues (enamel, dentine and root cement) caused by bacterial factors i.e. etching reagents (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*), carbohydrates undergoing fermentation (monosaccharides: glucose, fructose, disaccharides: saccharose, lactose, maltose, polysaccharides: glucan, fructan, mutan, starch), tooth susceptibility and reaction time of pathogenic factors (RYS.1) [8,9,11,25]. This process will develop only if all above-mentioned factors occur together. In the first stage called reversible it results in decalcification of tissues, then irreversible disintegration of organic substances appears. The most important factors influencing the stability of the tissue structure are the following: pH, accumulation of mineral substances i.e. Ca, P, F on the enamel surface, in the plaque liquid and in the tooth surrounding saliva. Long-lasting decrease of pH below 5.5 causes an increase in the solubility of hydroxyapatites - mineral structural parts of dental tissues, and by means of their loss an increase in porosity and early carious lesion are induced [2,8,11,12,25]. In the beginning the changes are only visible on the ultrastructural level, but in the course of their progress they become clinically noticeable in the form of white or brown spot. The color of the lesion is the result of enamel porosity increase, which changes the light



RYS. 1. Główne czynniki etiologiczne wg Königa.
FIG. 1. Major ethiologic factors by König.

mineralnych elementów strukturalnych twardych tkanek zębów, a poprzez ich utratę wzrost porowatości i powstanie początkowej zmiany próchnicowej (caries incipiens, macula curiosa, early caries lesion, spot lesion) [2,8,11,12]. Początkowo zmiany te dostrzegalne są jedynie na poziomie ultrastrukturalnym, ale w miarę ich progresji stają się dostrzegalne klinicznie w postaci białej lub brązowej plamy. Kolor zmiany jest wynikiem wzrostu porowatości szkliwa, który zmienia rozproszenie światła. Wskaźnik refrakcji (wskaźnik załamania światła) szkliwa wynosi 1,62, natomiast wody - 1,33. Osuszenie powietrzem badanej powierzchni usuwa wodę z przestrzeni międzykrystalicznych, wypełnia je powietrzem, przez co zmniejsza wskaźnik refrakcji do 1,0. Występujące różnice w wartościach dostrzegalne są wizualnie [25]. Dalsza progresja zmiany powoduje rozwój choroby i nieodwracalną utratę tkanek twardych zęba z dalszymi konsekwencjami dla miazgi i tkanek okołowierzchołkowych. Zastosowanie technik optycznych tj. mikroskopia świetlna, elektronowa, czy obecnie coraz powszechniej stosowana konfokalna, umożliwiają między innymi wnikanie w poziomy mikro i ultrastrukturalne dając możliwość dokładnego poznawania struktury zmiany oraz jej składu chemicznego, monitorują zastosowane metody lecznicze, określają przebieg i charakter procesów de i remineralizacyjnych oraz oceniają skuteczność działania użytych preparatów leczniczych na wyżej wymienione zjawiska [1,2,5,6,7,9,10,12,13,14,15,18,24]. Wszystko to powoduje aktywny rozwój tych dziedzin stomatologii, które zajmują się wczesnym wykrywaniem początkowych objawów choroby, prawidłową profilaktyką oraz nowymi metodami leczenia polegającymi na zachowaniu maksymalnej ilości zdrowej tkanki. Metody konwencjonalne (inwazyjne) bazujące na mechanicznym usunięciu tkanek zmienionych próchnicowo i zastąpieniu ich materiałami odtwórczymi są powoli zastępowane tzw. metodami zachowawczymi, których celem jest zatrzymanie procesu chorobowego poprzez ponowne wbudowanie utraconych związków nieorganicznych. Celem badania było określenie zmian strukturalnych charakterystycznych dla wczesnych zmian próchnicowych zachodzących w obrębie szkliwa w porównaniu ze szkliwem zdrowym i na tej podstawie opracowanie najbardziej optymalnej metody ich leczenia.

Omówienie badania

W świetle piśmiennictwa [5,6,7,8,12,13,19,24,25] badanie SEM umożliwia wnikliwą analizę szkliwa na poziomie ultrastrukturalnym oraz uwidacznia cztery warstwy wczesnej zmiany próchnicowej tj: powierzchniową, centralną, ciemną i przeźroczystą (RYS.2). Warstwa powierzchniowa o głębokości od 20-50µm pokrywa powierzchnię wczesnej zmiany próchnicowej, jest wysoko zmineralizowana i strukturą przypomina zdrowe szkliwo. Objętość porów w tej warstwie wynosi 1% (w szkliwie zdrowym około 0,1%) i taka sama jest utrata substancji mineralnych. Warstwa centralna (body of the lesion) stanowi największą część zmiany, gdzie objętość porów waha się od 5% obwodowo do 25%

diffusion. The refraction index (refraction of light index) of the enamel equals 1.62 whereas of water it is 1.33. Draining the researched surface with the air removes water from the inter-crystalline spaces and fills them with air reducing the refraction index to 1.0. The differences in numbers are seen with the naked eye [25]. Further progress of change results in disease development and irreversible loss of dental tissues with further consequences in pulp and periapical tissues. The application of modern optic techniques i.e. light microscopes, electron microscopes or more and more commonly used today confocal technique enables penetration of micro- and ultrastructural levels providing the opportunity of precise investigation of the lesion structure and its chemical composition, monitors the applied methods of treatment, determines the course and character of de- and remineralization processes and evaluates the effectiveness of used preparations on the above-mentioned phenomena [1,2,5,6,7,9,10,12,13,14,15,18,24,25]. All this results in an active development of these branches of dentistry which deal with early identification of initial symptoms of disease, correct prophylaxis and new methods of treatment with keeping the maximum of sound tissue. Conventional methods (invasive) based on mechanical removal of carious tissues and replacement with reconstructive materials are slowly replaced with preventive methods which aim at stopping the process by rebuilding the lost inorganic compounds. The aim of the study is to determine the structural changes characteristic to early stages of caries appearing within enamel in comparison with sound enamel and as a result working out the most optimal method of their treatment.

Discussion

According to the literature [5,6,7,8,12,13,19,24,25] SEM examination enables thorough analysis of enamel on the ultrastructural level and shows four zones in the first stage of caries i.e. the superficial zone, body of the lesion, dark zone and translucent zone (FIG.2). The superficial zone, 20-50 µm deep, covers the surface of the first stage of caries, it is highly mineralized and its structure resembles sound enamel. The porosity in this layer and the loss of mineral substances equals 1% (in healthy enamel about 0.1%). Body of the lesion constitutes the largest proportion of caries, where the porosity varies from 5% in the periphery to 25% in the center of this layer. The dark zone is marked with different sizes of pores (2-4%) and loss of mineral substances amounting to 2-5%. Translucent zone directly bordering the sound enamel lies at the advancing front of the lesion. This zone does not occur in each first stage of caries, it is the first visible sign of pathological process and it shows the loss of mineral substances ranging between 1-2% and porosity increase by about 1% [5,9,10,11,12,13,16,19].

The own studies on structure and chemical composition of early carious lesion were carried out by means of the scanning electron microscope - Joel JSM 5800 LV. The experimental material consisted of human teeth extracted due to the orthodontic causes, healthy/sound teeth and with early carious change. In FIG.3a a macroscopic picture of the adjacent proximal surface of the tooth 15 is presented (right, upper, second premolar) with clinically distinguished first stage of caries in the form of brown spot - macula fusca. The surface of the lesion is blurred, it shows the loss of translucency, but it is smooth and shiny. The illustration of the same change, viewed in 90 times magnification (FIG.3b) shows intact surface layer overlying a sub-surface lesion sharply separated from the healthy enamel constituting the body of the lesion - described earlier on the basis of litera-

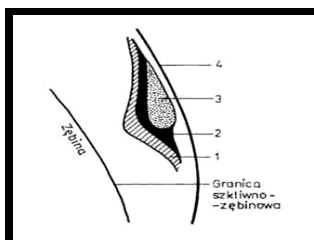
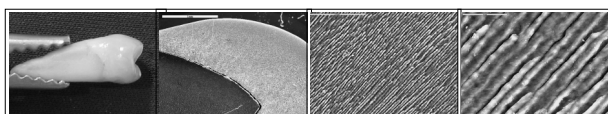


FIG. 2. Schema of early stage of caries: 1-translucent zone, 2-dark zone, 3-central zone body of the lesion", 4-superficial zone

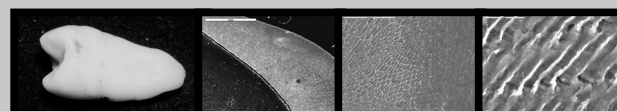
w części środkowej. Warstwa ciemna charakteryzuje się występowaniem różnej wielkości porów (2-4%) i ubytkiem substancji mineralnych sięgających od 2 do 5%. Ostatnia warstwa, licząc od strony powierzchni zmiany, to warstwa przeźroczysta granicząca bezpośrednio ze zdrowym szkliwem. Nie występuje we wszystkich tworzących się wczesnych zmianach próchnicowych, jest pierwszą widoczną oznaką procesu patologicznego i wykazuje utratę substancji mineralnych w granicach około 1-2% oraz wzrost porowatości o około 1% [5,9,10,11,12,13,16,19,25].

Badania własne nad strukturą i składem chemicznym wczesnych zmian próchnicowych przeprowadzono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego - Joel JSM 5800 LV. Materiał badawczy stanowiły ludzkie zęby usunięte z powodów ortodontycznych, zdrowe oraz z początkową zmianą próchnicową. Na RYS.3a umieszczono zdjęcie makroskopowe powierzchni stycznej bliższej przykładowego zęba 15 (prawy, górny, drugi przedtrzonowiec) z widoczną klinicznie początkową zmianą próchnicową w postaci brunatnej plamy - macula fusca. Powierzchnia zmiany wykazuje zmętnienie i utratę przezierności, ale jest gładka i świecąca. Obraz tej samej zmiany, oglądany w powiększeniu 90-krotnym (RYS.3b) ukazuje nietkniętą warstwę powierzchniową pokrywającą podpowierzchniowe uszkodzenie ostro odgraniczone od zdrowego szkliwa, czyli wcześniej już omówioną na podstawie piśmiennictwa warstwę centralną - body of the lesion. Większe powiększenia - 220-krotnym i 5000-krotnym - pozwoliły wniknąć w strukturę zmiany oraz ocenić uszkodzenia pryzmatów szklawych (RYS.3c i 3d). W wyniku procesu próchnicowego doszło do częściowego, dość nieregularnego ich rozpuszczenia, zmniejszenia ich szerokości i grubości oraz wzrostu objętości wolnych przestrzeni międzykrystalicznych oddzielających ściśle dotychczas upakowane kryształy. Zmiana wielkości kryształów jest dość znaczna, gdyż bazując na danych z literatury, ich średnica po demineralizacji waha się w granicach 10-30 nm, przy normalnych rozmiarach zdrowego apatytu - 35 do 40 nm [6,7,11]. Obserwowane pryzmaty wykazują w większości uszkodzenia rdzeni i poszerzenia osłonki, czyli tzw. pierwszy typ demineralizacji wg Silverstone'a [5,6,7,12]. Nadaje im to specyficzny obraz określany jako arkadowy [23] (RYS. 3c). Uzyskane w przeprowadzonych badaniach obrazy są zgodne z wynikami innych prac [5,6,7,10,11,12]. W celach porównawczych wykonane zostały również badania powierzchni zdrowego szkliwa. RYS. 4a przedstawia zdjęcie makroskopowe powierzchni



RYS. 4. Ząb 25: a) powierzchnia zdrowego szkliwa (zdjęcie makroskopowe), b) zdrowy (SEM, 90x), c) zdrowy (SEM,220x), d) zdrowy (SEM,5000x).

FIG. 4. Tooth 25: a) the surface of sound enamel (macroscopic picture), b) healthy (SEM,90x), c) healthy (SEM,220x), d) healthy (SEM,5000x).



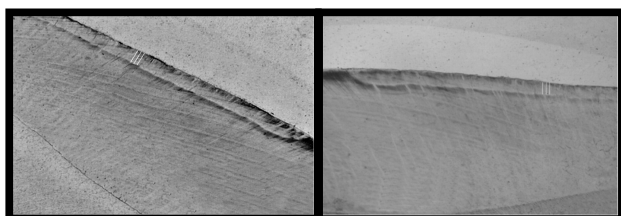
RYS. 3. Ząb15: a) początkowa zmiana próchnicowa - macula alba (zdjęcie makroskopowe), b) macula fusca (SEM,90x), c) macula fusca (SEM,220x), d) macula fusca (SEM,5000x).

FIG. 3. Tooth 15: a) early stage of caries-macula alba (macroscopic picture), b) macula fusca (SEM,90x), c) macula fusca (SEM,220x), d) macula fusca (SEM,5000x).

ture. High magnifications of 220 times and 5000 times enabled the investigation of the lesion structure and evaluation of enamel prism damages (FIG.3c and 3d). As a result of carious process the peripheries of individual crystals were partly and irregularly dissolved, reduced in thickness and width resulting with enlarged inter-crystalline spaces. The size change of crystals is considerable because according to the data from literature their diameter after demineralization ranges from 10 to 30 nm with normal/regular sizes of sound apatite - 35 to 40 nm [6,7,11]. The majority of investigated prisms show core damages and expansion of the circumulus i.e. the first type of demineralization according to Silverstone [5,6,7,12]. It gives them a specific characteristic called arch view [23] (FIG.3c). The obtained pictures correspond with the results coming from other papers [5, 6, 7,10,11,12]. For comparison the surfaces of sound enamel were examined. FIG. 4a presents macroscopic picture of adjacent proximal surface of tooth 25 (left, upper, second premolar) considered clinically healthy. The pictures at higher magnifications - 90 times (FIG.4b), 220 times (FIG.4c) show orderly structure of healthy tissue consisting of uniformly placed crystals separated with intraprismatic spaces with few gaps. In the structure of single crystals no signs of circular/border continuity loss and core structure changes were noticed. The shapes and sizes do not break the rule, they are recurrent and regular. The porosity volume does not exceed 0,1% which stays in accordance with the literature [11].

The knowledge of early caries change structure (referred to above) enables starting the immediate treatment, which aim at preventing further development of disease process. This stage of caries is considered the only reversible form of disease. Stopping the caries process is possible by means of remineralization and it is based on whole or partial "healing" of enamel by building-in the mineral substances, most importantly Calcium and Phosphorus, into undemineralized parts of tissue [13,14,15,17,18,19,20,23]. This process is influenced by several independent factors i.e. saliva components, especially contents of Ca, F, P, relevant diet habits and Fluor compounds supply. The surface layer of the early carious change is well-mineralized and the porosity is not great, so it constitutes certain obstacle for the induced process of remineralization of deeper layers [9,13,16,17,21,22,24]. Probably the method of single etching of the enamel surface by means of 37% phosphoric acid, limited only to the thin outer layer should bring about its removal and reveal diffusion ways for de- and remineralization processes, which will result in increase of remineralization processes efficiency [6,7,10,21,22,23,24]. The conducted experiment was to prove the hypothesis.

The experimental material consisted of human teeth samples with artificially evoked early carious change, which were divided depending on the applied method of treatment into 4 groups: A, B, C and D. In each group different remineralization conditions or different remineralization



RYS. 5. Obraz histologiczny zmiany; a) po 4 tygodniach leczenia, średnia głębokość warstwy powierzchniowej 158µm, grupa D; b) po 10 tygodniach leczenia, średnia głębokość warstwy powierzchniowej 141µm, grupa D.

FIG. 5. Histological illustration of the change: a) after 4 weeks of treatment, average depth of superficial layer 158µm, group D; b) after 10 weeks of treatment, average depth of superficial layer 141µm, group D.

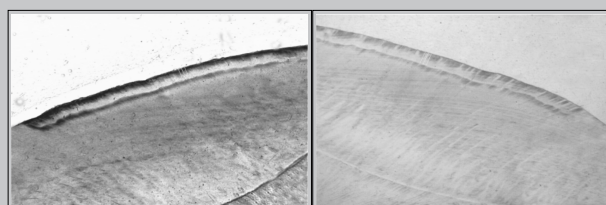
Grupa A Group A n=6	bez wytrawiania 37% kw. ortofosforowym, szczotkowanie 2x dziennie przez 2-3 minuty pastą z zawartością F^- (NaF-1400 ppm) the surfaces were treated with fluoride toothpaste (NaF-1400 ppm) for 3 minutes a day during 10 weeks
Grupa B Group B n=6	wytrawianie 37% kwasem ortofosforowym, szczotkowanie 2x dziennie przez 2-3 minuty pastą z zawartością F^- (NaF - 1400 ppm) the surfaces were treated with fluoride toothpaste (NaF-1400 ppm) for 3 minutes a day during 10 weeks, the brushing was preceded by the 30 second etching with 37% phosphoric acid
Grupa C Group C n=6	bez wytrawiania 37% kw. ortofosforowym, szczotkowanie 2x dziennie przez 2-3 minuty pastą z zawartością Ca i P the surfaces were treated with toothpaste containing hydroxyapatite and phosphates ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) for 3 minutes a day during 10 weeks
Grupa D Group D n=6	wytrawianie 37% kwasem ortofosforowym, szczotkowanie 2x dziennie przez 2-3 minuty pastą z zawartością Ca i P the surfaces were treated with toothpaste containing hydroxyapatite and phosphates ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) for 3 minutes a day during 10 weeks, the brushing was preceded by the 30 second etching with 37% phosphoric acid

TAB. 1. Podział na 4 grupy doświadczalne w zależności od zastosowanej metody remineralizacyjnej.

TAB. 1. Division into 4 experimental groups depending on the applied remineralization method.

stycznej bliższej zęba 25 (lewy, górny, drugi przedtrzonowiec) uznanej za zdrową klinicznie. Obrazy w większych powiększeniach - 90-krotnym (RYS.4b), 220-krotnym (RYS. 4c) i 5000- krotnym (RYS.4d) uwidaczniają uporządkowaną strukturę zdrowej tkanki złożonej ze ściśle upakowanych kryształów poprzedzielanych przestrzeniami międzypryzmatycznymi o niewielkim świetle. W strukturze pojedynczych kryształów nie zauważono utraty ciągłości otoczki i zmiany struktury rdzeni. Kształty i rozmiary nie odbiegają od przyjętej normy, są powtarzalne i regularne. Objętość porów nie przekracza 0,1%, tak jak to zostało opisane w piśmiennictwie [11,25].

Znajomość struktury wczesnej zmiany próchnicowej (wyżej omówionej) umożliwia podjęcie natychmiastowych działań leczniczych, których celem jest zapobieganie dalszemu rozwojowi procesu chorobowego. Ten etap próchnicy uważany jest za jedyną odwracalną jej postać. Zatrzymanie procesu próchnicowego następuje na drodze remineralizacji i polega na całkowitym lub częściowym "wygojeniu się" szkliwa poprzez ponowne wbudowanie substancji mineralnych, przede wszystkim wapniowych i fosforanowych, w zdeminerlizowane części tkanki [13,14,15,17,18,19,20,23,25]. Na proces ten ma wpływ kilka niezależnych czynników tj. składniki śliny, w szczególności zawartość Ca, F, P, odpowiednie nawyki dietetyczne oraz miejscowy dowóz związków fluoru. Powierzchnowa warstwa wczesnej zmiany próchnicowej jest jednak dobrze zmineralizowana i cechuje się niewielką porowatością, a zatem stanowi pewne ograniczenie dla indukowanego procesu remineralizacyjnego warstw głębiej leżących [9,13,16,17,21,22,24,25]. Prawdopodobnie



RYS. 6. Obraz histologiczny zmiany; a) po 4 tygodniach leczenia, średnia głębokość warstwy powierzchniowej 160,9µm, grupa A; b) po 10 tygodniach leczenia, średnia głębokość warstwy powierzchniowej 140,8µm, grupa A.

FIG. 6. Histological illustration of the change: a) after 4 weeks of treatment, average depth of superficial layer 160,9 µm, group A; b) after 10 weeks of treatment, average depth of superficial layer 140,8 µm, group A.

preparation were used - TAB.1. Treated changes were investigated following 4 and 10 weeks of the experiment, the depth of artificially evoked changes and the differences in their size after applying certain therapeutic methods were determined. For this purpose the light microscope - Olympus BX 50 connected with computer system of image analysis - Multiscan Base (08.98 version) was used. As it turned out the best results i.e. the greatest decrease of lesion was obtained in group D, where the therapeutic method was based on brushing the teeth with the toothpaste containing $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, twice a day for 3 minutes after single etching of the surface with the phosphoric acid. FIG.5a presents the change after 4 weeks of brushing, FIG.5b - after the next 6 weeks, where the depth difference amounted on average 22% i.e. $0,0326 \pm 0,008$ mm. The worst was the traditional method based on brushing the teeth with the toothpaste containing Fluor in the form of NaF - 1400 ppm. In this group the healing of the change was significantly smaller - on average 7.9% i.e. $0,0116 \pm 0,002$ mm. The demonstration histological images were presented in FIG. 6a and 6b - after 4 and 10 weeks of demineralization respectively. The obtained results show that the modernization of the traditional remineralization measures by means of initial etching of demineralized surface of the change can visibly increase the effectiveness of treatment and stop it. However, it should be noticed that the monitoring of the treatment was possible only thanks to the light microscope usage.

Conclusion

Discovering caries in the initial stage enables to stop or reverse the disease process by means of non-invasive methods. If caries is not stopped at the spot stage, the destruction of dental tissues becomes irreversible. In such a case the only form of treatment is invasive method based on removal of changed tissues and replacement with reconstructive material. In this case it should be noticed that no filling material has such physical-chemical parameters and durability as healthy dental tissues. Therefore the removal and filling decision results in several consecutive replacements connected with subsequent loss of tissues. The application of the above-mentioned microscopic techniques enables better and more detailed investigation of the disease mechanisms which results in obtaining more effectiveness in its treatment and its prevention. The possibility of using these methods only in laboratory conditions due to the size is a considerable drawback. There is however the possibility that in the future making the described systems smaller will give the opportunity of using them also in clinical conditions.

metoda jednorazowego trawienia powierzchni szkliwa za pomocą 37% kwasu ortofosforowego, ograniczona tylko do cienkiej warstwy zewnętrznej, powinna spowodować jej usunięcie i odsłonięcie dróg dyfuzji dla procesów de- i remineralizacji, co przyczyni się do zwiększenia skuteczności działań remineralizacyjnych [6,7,10,21,22,23,24]. Przeprowadzone doświadczenie miało na celu udowodnić tę tezę. Materiał badawczy stanowiły próbki ludzkich zębów ze sztuczną wczesną zmianą próchnicową, które podzielono w zależności od stosowanej metody leczniczej na 4 grupy: A, B, C i D. W każdej grupie zastosowano inne warunki remineralizacji lub inny preparat remineralizacyjny - Tab.1. Leczone zmiany badano po 4 i 10 tygodniach doświadczenia określając zarówno głębokość sztucznie wywołanych zmian, jak i różnice w ich zasięgu po zastosowaniu określonych metod terapeutycznych. Użyto w tym celu mikroskopu świetlnego - Olympus BX 50 połączonego z systemem komputerowej analizy obrazu - program Multiscan Base (wersja 08.98). Jak się okazało najlepsze wyniki, czyli największe zmniejszenie się zmiany, uzyskano w grupie D, gdzie metoda terapeutyczna polegająca na szczotkowaniu zębów pastą dostępną w handlu z zawartością $\text{CaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2x dziennie przez 3 minuty, poprzedzona została jednorazowym wytrawieniem powierzchni zmiany kwasem ortofosforowym. RYS.5a przedstawia zmianę po 4 tygodniach szczotkowania, RYS.5b - po kolejnych 6 tygodniach, gdzie różnica głębokości wyniosła średnio 22% tj. $0,0326 \pm 0,008$ mm. Najstabilniej wypadła metoda tradycyjna polegająca na szczotkowaniu zębów, 2x dziennie przez 3 minuty, pastą z fluorem w postaci NaF - 1400 ppm. W grupie tej (A) doszło do istotnie mniejszego wygojenia zmiany - średnio 7,9% tj. $0,0116 \pm 0,002$ mm. Przykładowe obrazy histologiczne zamieszczono na RYS.6a i 6b - odpowiednio po 4 i 10 tygodniach demineralizacji. Uzyskane rezultaty badań nasuwają wnioski, że modernizacja klasycznego postępowania remineralizacyjnego poprzez wstępne wytrawienie zdemineralizowanej powierzchni zmiany może w widoczny sposób zwiększyć skuteczność leczenia i spowodować jej zatrzymanie się. Należy jednak podkreślić, że monitorowanie procesu terapeutycznego możliwe było tylko dzięki zastosowaniu mikroskopu świetlnego.

Wnioski

Wykrycie próchnicy w początkowym stadium umożliwia zatrzymanie lub odwrócenie procesu chorobowego na drodze nieinwazyjnej. Jeżeli próchnica nie zostanie zatrzymana na etapie plamy próchnicowej, destrukcja tkanek twardej zęba staje się procesem nieodwracalnym. W takiej sytuacji jedyną formą leczenia jest postępowanie inwazyjne polegające na usunięciu zmienionych tkanek i zastąpieniu ich materiałem odtwórczym. Przy tego typu działaniu należy pamiętać, że żaden materiał wypełnieniowy nie ma takich parametrów fizyko-chemicznych i trwałości jak zdrowe tkanki twarde zęba. A zatem decyzja o ich usunięciu i wypełnieniu wiąże się z koniecznością kilkukrotnej późniejszej ich wymiany, połączonej z dalszą utratą tkanek. Zastosowanie wyżej wymienionych badań, a w szczególności wybranych technik mikroskopowych umożliwia lepsze i bardziej szczegółowe poznanie mechanizmów choroby, a co za tym idzie uzyskanie większej skuteczności w jej leczeniu i zapobieganiu. Dużym ograniczeniem jest, ze względu na rozmiary, używanie tych badań tylko w warunkach laboratoryjnych. Istnieje jednak prawdopodobieństwo, że w przyszłości, dzięki zminiaturyzowaniu opisanych systemów, powstanie możliwość zastosowania ich także w warunkach klinicznych.

Piśmiennictwo

References

- [1] Kasprzak M., Konfokalna laserowa mikroskopia skaningowa - nowa metoda obrazowania w stomatologii. *Stom Współ* 1, 2003, str. 45-48.
- [2] Knychalska-Karwan Z., Pawlicki R., Próchnica zębów mlecznych mlecznych w obrazie morfologicznym w SEM i mikroanalitycznym w mikroskondzie rtg. *Czas Stomatol* LII, 1, 1999, str. 8-13.
- [3] Szczepańska J., Badania morfologiczne nad remineralizacją szkliwa zębów mlecznych. *Czas Stomatol* LIII, 7, 2000, str. 399-403.
- [4] Surdacka A., Matthews-Brzozowska T., Stopa J., Wpływ żelu z dodatkiem syntetycznego hydroksyapatytu na demineralizację sztucznych uszkodzeń szkliwa w warunkach in situ. *Czas Stomatol* LVI, 6, 2003, str. 373-378.
- [5] Matthews-Brzozowska T., Wczesne zmiany próchnicowe w badaniu profilometrycznym i mikrostrukturalnym. *Rozprawa habilitacyjna*. 1996, Wydawnictwo Panoptikon Poznań.
- [6] Hicks M.J., Silverstone L.M., Acid-etching of caries-like lesion of enamel; a polarized light microscopic study. *Caries Res* 18, 4, 1984, str. 315-326.
- [7] Hicks M.J., Silverstone L.M., Acid-etching of caries-like lesion of enamel; a scanning microscopic study. *Caries Res* 18, 4, 1984, str. 327-335.
- [8] Piątowska D., Zarys kariologii. *Med Tour Press International Wydawnictwo Medyczne*, Warszawa 2002, str. 49 - 64.
- [9] Arends J., Christoffersen J., The nature of early caries lesions in enamel. *J Dent Res* 65, 1, 1986, str. 2-11.
- [10] Möller H., Schröder U., Early natural subsurface caries. *Caries Res* 20, 2, 1986, str. 97-102.
- [11] Robinson C., Kirkham J., Brookes S.J., Shore R., Dental enamel - formation to destruction. *CRC Press* 1995, str. 167 - 188.
- [12] Matthews-Brzozowska T., Surdacka A., Ultrastrukturalny obraz szkliwa w próchnicy początkowej. *Czas Stomatol* XLIII, 8, 1990, str. 447 - 452.
- [13] Napiontek-Kubaneck H., Ocena ultrastrukturalna plam próchnicowych próchnicowych SEM po stosowaniu wybranych środków profilaktycznych. *Czas Stomatol* XLVII, 11, 1994, str. 737-742.
- [14] Exterkate R.A.M., Damen J.J.M., Ten Cate J.M., A single-section Model for Enamel De- and Remineralization Studies.1. The Effects of Different Ca/P Ratios in Remineralization Solution. *J Dent Res* 1993, 72, 12, 1993, str. 1599-1603.
- [15] Ten Cate J.M., In vitro Studies on the Effects of fluoride on De- and Remineralization. *J Dent Res* 1990, 69 (Spec Iss), 1990, str. 614-619.
- [16] Larsen M.J., Effect of the diffusion layer on the nature of enamel demineralization. *Caries Res* 25, 3, 1991, str. 161-165.
- [17] Larsen M.J., Fejerskov O., Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions. *Scand J Dent Res* 97, 4, 1989, str. 285-296.
- [18] Itthagarun A., Wei S.H.Y., Wefel J.S., Morphology of initial lesions of enamel treated with different commercial dentifrices using a pH cycling model: Scanning Electron Microscopy observations. *Int Dent J* 49, 6, 1999, str. 352-360.
- [19] Kaczmarek U., Nowe aspekty kariostatycznego działania fluoru. *Wroc Stomat* 15, 23, 1986, str. 225-234.
- [20] Kaczmarek U., Wpływ jonów fluorkowych na szkliwo. *Wroc Stomat* 26, 1989, str. 185-191.
- [21] Al-Khateeb S., Exterkate R., Angmar-Mansson B., Ten Cate B., Effect of acid-etching on remineralization of enamel white spot lesions. *Acta Odontol Scand* 58, 1, 2000, str. 31-36.
- [22] De Paola P.F., Aasenden R., Brudevold F. The use of topically applied acidulated phosphate-fluoride preceded by mild etching of the enamel: one year clinical trial. *Arch Oral Biol* 16, 1971, str. 1155-1163.
- [23] Belser U., Sporri S., Muhlemann H.R., Uptake and retention of fluoride by intact and etched enamel. *Helv Odont Acta* 19, 2, 1975, str. 69-71.
- [24] Tandon S., Mathew T.A., Effect of acid-etching on fluoride-treated caries-like lesions of enamel: a SEM study. *J Dent Child* 64, 5, 1997, str. 344-348.
- [25] Jańczuk Z., Stomatologia zachowawcza - zarys kliniczny, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004, Patologia próchnicy - rozdz. 11, str. 228-243.

WPŁYW MODYFIKACJI POWIERZCHNI POLI(ε- KAPROLAKTONU) NA ADHERENCJĘ OSTEObLASTÓW W HODOWLI

RADOSŁAW M. OLKOWSKI*, KATARZYNA FILIPCZAK**, PIOTR
ULAŃSKI**, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ*

*ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA, AKADEMIA MEDYCZNA
W WARSZAWIE, UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA

**INSTYTUT TECHNIKI RADIACYJNEJ, POLITECHNIKA ŁÓDZKA, UL.
WRÓBLEWSKIEGO 15, 93-590 ŁÓDŹ

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),175-177]

Wstęp

Poli(ε-kaprolakton) (PCL) jest polimerem, który ze względu na biogodność, nietoksyczność i powolny czas biodegradacji uważany jest za materiał obiecujący jako rusztowanie do transplantacji komórek kostnych [1]. Właściwości powierzchniowe PCL, zwłaszcza niska energia powierzchniowa, utrudniają jednak adhezję komórek kostnych [2]. Adsorpcja hydroksyapatytu na powierzchni PCL mogłaby ułatwić kontakt osteoblastów z tym polimerem, dzięki stworzeniu kompozytu przypominającego naturalną budowę kości ludzkiej [3]. Wykazano, że apatyt o budowie zbliżonej do hydroksyapatytu naturalnego osadza się na powierzchni PCL pod wpływem traktowania roztworami NaOH i SBF (Simulated Body Fluid) [4].

Celem pracy jest ocena wpływu, jaki inkubacja w obecności NaOH i SBF wywiera na biogodność poli(ε-kaprolaktonu).

Materiały i metody

Próbki PCL wytworzone zostały w postaci krążków o średnicy 6,2 mm i wysokości 1 mm. Przygotowano dwa rodzaje próbek - część została wykonana przez rozpuszczenie PCL w acetonie i wytrącenie polimeru z mieszaniny woda/acetone (PCL-1), część natomiast przez rozpuszczenie i wytrącenie PCL w tych samych warunkach, dodatkowo ze stopieniem próbek w temp. 80°C (PCL-2).

Próbki poddano modyfikacji powierzchni. Próbki moczone były w 10M NaOH przez 48 godzin w temperaturze 50°C. Następnie przemywano je wodą i część z nich suszono, a część inkubowano w roztworze SBF w 37°C przez 24 godziny. Próbki sterylizowano za pomocą promieniowania gamma o dawce 25kGy.

Próbki polimerów umieszczono w studzienkach mikropłytki hodowlanej, 96-studzienkowej i przez 12h inkubowano w pełnej pożywce hodowlanej (DMEM + FBS + L-glutamina + antybiotyk/antymikotyk+ kwas askorbinowy) w temperaturze 37°C.

W doświadczeniu wykorzystano osteoblasty ludzkie z hodowli pierwotnej. Do 96-studzienkowej płytki hodowlanej nanoszono zawiesinę komórek w gęstości 5000 komórek na studzienkę. Po 24 h hodowli usunięto pożywkę, a polimery przepłukano roztworem buforu fosforanowego PBS i utrwalone komórki poddano obserwacji morfologicznej.

Morfologię komórek oceniano oglądając powierzchnię próbek w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon Eclipse TE2000-U, przy powiększeniu 100x. Na każdej próbce (pole powierzchni 30,2 mm²) obserwowano dwa pola widzenia (pole

INFLUENCE OF POLY(ε- CAPROLACTONE) SURFACE MODIFICATION ON OSTEObLAST ADHESION IN CULTURE

RADOSŁAW M. OLKOWSKI*, KATARZYNA FILIPCZAK**, PIOTR
ULAŃSKI**, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ*

*DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY, MEDICAL
UNIVERSITY OF WARSAW, CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSAW,
POLAND

**INSTITUTE OF APPLIED RADIATION CHEMISTRY, TECHNICAL
UNIVERSITY OF ŁÓDŹ,

Wróblewskiego 15, 93-590 Łódź, Poland

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),175-177]

Introduction

Poly(ε-caprolactone) (PCL) is a polymer considered a promising material as a scaffold for bone cells transplantation, because of its biocompatibility, non-toxicity and long time of biodegradation [1]. However, surface properties of PCL, especially low surface energy, disturb the adherence of bone cells [2]. Adsorption of hydroxyapatite on the surface of PCL could facilitate osteoblast contact with this material, because of constituting a composite with a structure similar to natural bone [3]. It was shown, that apatite with a structure similar to natural hydroxyapatite settles on the PCL surface after treating with NaOH and SBF [4].

The aim of the present study is to estimate the influence of incubation with NaOH and SBF on poly(ε-caprolactone) biocompatibility.

Materials and methods

Samples of PCL were prepared in the shape of discs, of a diameter of 6.2 mm and height of 1 mm. Two types of samples were examined - some were made by dissolving PCL in acetone and precipitating the polymer from a mixture of acetone/water (PCL-1), and some by dissolving and precipitating PCL in the same conditions, with final melting of the samples at 80°C (PCL-2).

The samples were soaked in 10M NaOH at 50°C. After 48h they were rinsed, half was dried and half was incubated in SBF solution at 37°C for 24 h. Samples were sterilized by exposure to a dose of 25 kGy of ionising radiation.

Next, the samples of polymer were put in wells of 96-well microplate and incubated for 12h in culture medium (DMEM + FBS + L-glutamine + antibiotic/antimycotic + ascorbic acid) at 37°C.

Human osteoblasts from primary culture were used in this experiment. The suspension of cells, with a density of 5000 cells per well was put into 96-well culture microplate. After 24 h the medium was removed, the polymers were rinsed with a phosphate buffer and the fixed cells were observed. Cell morphology was estimated by observation of the surface of the samples under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE2000-U). Two visual fields (area 3.5 mm²) were observed on each sample (area 30.2 mm²). The fields did not cover each other nor include sample edges. Their summarised field of observation covers 23% of the sample area. On every visual field cells were counted - spread cells were counted apart from non-spread cells. Compact, spherical or ellipsoidal objects were recognised as non-spread cells. Irregular or spindleform cells were recognised as spread.

175
.....

powierzchni 3,5 mm²), nie zachodzące na siebie, nie obejmujące brzegów próbki, obejmujące łącznie 23% całej powierzchni. W każdym polu widzenia liczono widoczne komórki - osobno liczono komórki nierozpłaszczone, osobno rozpłaszczone. Za komórki nierozpłaszczone uznawano obiekty zwarte, kształtu kulistego bądź elipsoidalnego, za rozpłaszczone natomiast komórki o kształcie nieregularnym lub wrzecionowatym, z widocznymi wypustkami.

Wyniki

Wyniki przedstawiono w postaci wykresu, jako procent liczby komórek na podłożu kontrolnym, tj. TCPS (RYS.1) oraz jako procent komórek rozpłaszczonych w stosunku do całkowitej liczby osteoblastów na danym podłożu (RYS.2). Skróty oznaczają:

- TCPS - polistyren - standardowe podłoże do hodowli komórek;
- PCL-1 - PCL wytrącany z mieszaniny woda/acetone;
- PCL-2 - PCL wytrącany z mieszaniny woda/acetone i stopiony;
- NaOH - materiał poddany inkubacji w 10 M NaOH;
- SBF - materiał poddany inkubacji w SBF.

Na powierzchni PCL-1 zaobserwowano mniej komórek, niż na podłożu kontrolnym. Od 41% do 52% komórek na PCL-1 uległo rozpłaszczeniu. Do PCL-2 zaadherowała większa liczba komórek, niż do TCPS i PCL-1. Najwięcej komórek zaobserwowano na PCL-2 SBF (197% kontroli). Proporcja komórek rozpłaszczonych do wszystkich komórek nie osiąga na PCL-2 poziomu kontroli (92%), ale jest wyższa, niż na PCL-1 i wynosi od 67% do 82%.

Dyskusja

Rekonstrukcja tkanki metodami inżynierii tkankowej opiera się na hodowli komórek in vitro w bezpośrednim kontakcie z biomateriałem [5]. Osteoblasty w hodowli in vitro wymagają do proliferacji i różnicowania podłoża, do którego mogą przyczepić się i rozpłaszczyć [6], konieczne jest zatem nadanie potencjalnemu rusztowaniu takich właściwości powierzchniowych, które umożliwią adhezję komórek kostnych.

Przedstawione powyżej wyniki doświadczenia wskazują, że inkubacja w NaOH i SBF, jak również w każdym z tych roztworów osobno, powoduje, że do powierzchni PCL rozpuszczonego w acetonie i topionego (PCL-2) adheruje większa liczba komórek niż do próbek niemodyfikowanych. Liczba komórek na PCL-2 traktowanym NaOH i SBF przekracza liczbę komórek w kontroli, natomiast procent komórek rozpłaszczonych jest najwyższy na TCPS. Modyfikacja powierzchni PCL-2 umożliwia większej liczbie osteoblastów adhezję, prawdopodobnie dzięki rozwinięciu powierzchni, stworzeniu lepszych warunków do adsorpcji białek surowicy i pojawieniu się kryształów apatytu. Fakt, że procent komórek rozpłaszczonych zmniejsza się na powierzchniach modyfikowanych wskazuje jednak, że modyfikacja ułatwia jedynie początkowe etapy adhezji - kontakt i przyłgnięcie osteoblastów do biomateriału, natomiast faza rozpłaszczania ulega opóźnieniu. Ponieważ stosunek komórek rozpłaszczonych do całej populacji osteoblastów zmniejsza się w niewielkim stopniu, wydaje się, że funkcje komórek na modyfikowanym PCL-2 nie ulegną zaburzeniu. Obserwacje wykonano jedynie po 24 h od wysiania komórek na biomateriały, konieczne jest zatem przeprowadzenie badań w późniejszych punktach czasowych, dla sprawdzenia dalszego funkcjonowania osteoblastów na powierzchni PCL-2. Zwraca uwagę duża liczba komórek adherujących do PCL-2 traktowanego jedynie SBF, w porównaniu z próbkami

Results

Results were shown in a diagram, as number of cells on surface of investigated materials as a percentage of control (cells on TCPS) (FIG.1) and as a number of spread cells divided by the total cell number on a sample (in percent) (FIG.2).

- TCPS - tissue culture polystyrene
- PCL-1 - PCL precipitated from acetone/water mixture
- PCL-2 - PCL precipitated from acetone/water mixture and melted
- NaOH - material incubated in 10 M NaOH;
- SBF - material incubated in SBF.

Fewer cells were observed on PCL-1 than on control. 41-52% of cells on PCL-1 were spread. More cells adhered to PCL-2, than to TCPS and PCL-1. Most osteoblasts were observed on PCL-2 SBF-treated (197% of control). The ratio of spread to all cells is higher on TCPS (92%) than on PCL-2 (67-82%).

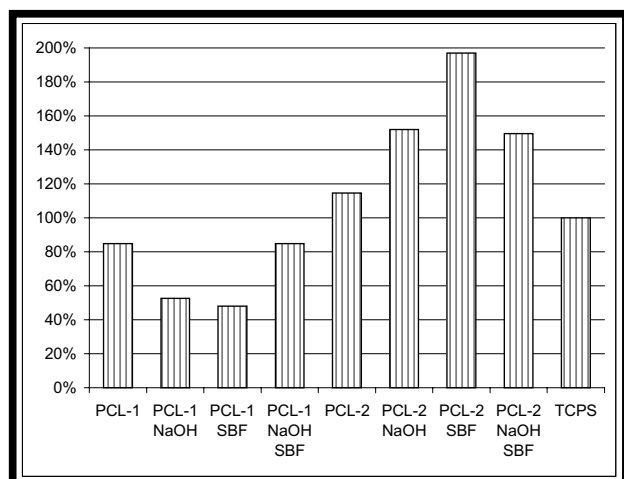
Discussion

Reconstruction of tissue by methods of tissue engineering is based on cell culture in vitro in direct contact with biomaterial [5]. For proliferation and differentiation, osteoblasts in vitro need support to adhere and spread [6], so potential scaffold has to have surface properties that facilitate bone cells adherence.

The results of experiment, presented above indicate that incubation in NaOH and SBF, and in each of these solutions apart, causes that more cells adhere to the surface of PCL dissolved in acetone and melted (PCL-2) than to non-modified samples. The number of cells on PCL-2 exceeds the number on the control. The percent of spread cells is highest on TCPS. PCL-2 surface modification enables adherence of a greater number of osteoblast, probably because of a developed area, creation of better conditions for serum protein adsorption and appearance of apatite crystals. Percent of spread cells decreases on modified surfaces, which indicates that modification facilitates only initial stages of adhesion - the contact and the attachment to the biomaterial. The spreading stage is delayed. It seems that the cell function on modified PCL-2 is not disturbed, because the ratio of spread cells to the whole population decreases only slightly. Observations were performed only 24 h after cell seeding on the biomaterial, so it is necessary to continue investigations at later time points, to confirm the later function of osteoblasts on PCL-2 surface. It should be noticed that the high number of cells was adhered to PCL-2 SBF-treated in comparison to NaOH-SBF-treated samples. The relationships between surface topography, hydroxyapatite adsorption and osteoblast adherence need further explanation.

The reduction of cell adhesion to acetone-precipitated PCL (PCL-1) occurs after an NaOH or SBF treatment (FIG.1). Using both NaOH and SBF causes that attractivity of PCL-1 is similar to non-treated PCL-1. Incubation with NaOH and SBF causes that the percentage of spread cells increases as compared to non-modified PCL-1, however it never reaches the level of PCL-2 and TCPS (FIG.2). The influence of these solutions on two sorts of PCL is different which may be related to the differences in the topography of sample surface.

Preliminary studies have shown that the surface of PCL-1 is more extended than the surface of PCL-2. This, as well as soaking PCL-1 samples in NaOH or SBF, may change the mechanical properties of the support, which could affect cell behaviour.



RYS. 1. Liczba komórek na powierzchni próbek materiałów jako % kontroli (TCPS).

FIG. 1. Number of cells on surface of materials as percentage of control (TCPS).

poddanymi działaniu NaOH i SBF. Związek pomiędzy topografią powierzchni i adsorpcją hydroksyapatytu, jak również wpływ tych czynników na adhezję osteoblastów, pozostaje kwestią do wyjaśnienia.

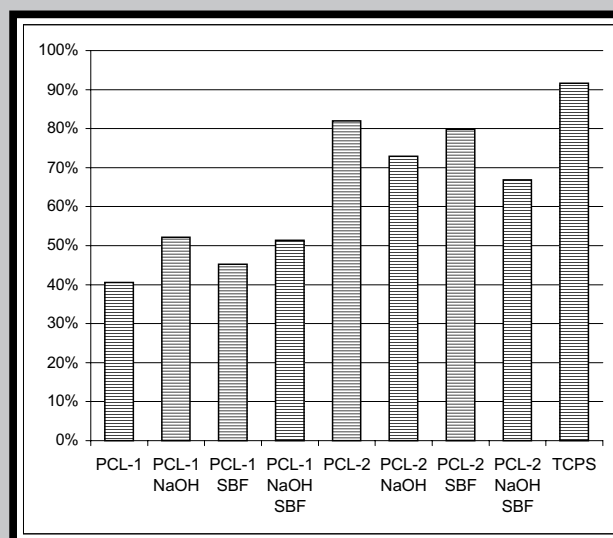
Traktowanie za pomocą NaOH lub SBF PCL wytrącanego z acetonu (PCL-1) powoduje zmniejszenie liczby komórek adhezujących do tego polimeru. Użycie obu tych roztworów powoduje, że atrakcyjność PCL-1 dla osteoblastów jest zbliżona do PCL-1 niemodyfikowanego (RYS.1). Inkubacja z NaOH i SBF powoduje, że procent komórek rozplaszczonych zwiększa się w stosunku do próbek niemodyfikowanych, nie osiągając jednak stopnia rozplaszczania osteoblastów na PCL-2 i TCPS (RYS.2). Odmienne wpływy roztworów na właściwości dwóch typów PCL może być związany z różnicami w topografii powierzchniowej próbek. Wstępne obserwacje wykazały, że PCL-1 ma powierzchnię bardziej rozwiniętą niż PCL-2. To, a także płukanie próbek PCL-1 w NaOH lub SBF może zmieniać właściwości mechaniczne podłoża, co także może mieć wpływ na zachowanie się komórek.

Wnioski

W pracy wykazano, że inkubacja poli(ϵ -kaprolaktonu) wytrącanego z acetonu i topionego, w NaOH i SBF powoduje wzrost liczby osteoblastów adhezujących do tego polimeru. Dalsze badania nad modyfikacją powierzchni PCL mogą przynieść interesujące efekty z punktu widzenia zastosowania tego tworzywa w inżynierii tkankowej kości.

Podziękowania

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji w ramach projektu badawczego zamawianego nr 05/PBZ-KBN-082/T08/2002/06 oraz z grantu Akademii Medycznej NZME/W2.



RYS. 2. Komórki rozplaszczone jako procent wszystkich komórek na danym materiale.

FIG. 2. Spread cells as percentage of all cells on the material.

Conclusions

Modification of poly(ϵ -caprolactone) precipitated from acetone and melted by means of its incubation in NaOH and SBF promotes osteoblasts adhesion to this polymer. Further studies on PCL surface modification may bring interesting results which might be applied to PCL scaffolds used in tissue engineering.

Acknowledgements

The present study has been financed by the Minister of Science and Information Society Technologies (grant No. 05/PBZ-KBN-082/T08/2002) and by the Medical University of Warsaw (grant NZME/W2).

Piśmiennictwo

References

- [1] J. Pachence, J. Kohn, Biodegradable polymers, in: R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti (Eds.), Principles of tissue engineering, Academic Press, New York, 2000, pp. 263-283.
- [2] J. Y. Lim, X. Liu, E. A. Vogler, H. J. Donahue, J Biomed Mater Res A 68 (2004) 504-512.
- [3] M. Jarcho, J. F. Kay, K. I. Gumaer, R. H. Doremus, H. P. Drobeck, J Bioeng 1 (1977) 79-92.
- [4] A. Oyane, M. Uchida, C. Choong, J. Triffitt, J. Jones, A. Ito, Biomaterials 26 (2005) 2407-2413.
- [5] R. Langer, J. P. Vacanti, Science 260 (1993) 920-926.
- [6] A. Hunter, C. W. Archer, P. S. Walker, G. W. Blunn, Biomaterials 16 (1995) 287-295.

CHARAKTERYSTYKI TRIBOLOGICZNE I FIZYKOCHEMICZNE MATERIAŁÓW NA STAŁE WYPEŁNIENIA STOMATOLOGICZNE

JOANNA ROMANIUK, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA,
KRZYSZTOF J. KURZYDŁOWSKI, JAN R. DĄBROWSKI

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań tarcia i uwalniania fluoru z kompozytowych materiałów stomatologicznych. Oceniano wpływ napelniaczy proszkowych w postaci nanokrzemionki oraz szkła ceramicznego na współczynnik tarcia i rodzaj zużycia materiału kompozytowego. Zużycie badanych materiałów określono metodą wagową. Badano także kinetykę uwalniania fluoru z kompozytów różniących się zawartością napelniacza w postaci szkła fluorowanego.

Słowa kluczowe: Tarcie, zużycie, uwalnianie fluoru, nanokrzemionka, ceramika

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),178-181]

Wprowadzenie

Stomatologiczne materiały kompozytowe składają się z osnowy polimerowej i napelniaczy proszkowych. Polepszenie adhezji nieorganicznego szkła do organicznej żywicy uzyskuje się w wyniku procesu silanizacji. Stosowany silan, dzięki właściwościom hydrofobowym, obniża także sorpcję wody przez kompozyty, a jego słaba reaktywność powoduje zmniejszenie skurczu polimeryzacyjnego materiału [1]. Właściwości materiału kompozytowego zależą w głównej mierze od rodzaju, wielkości, kształtu oraz twardości cząstek napelniaczy [2]. Najnowsze doniesienia literaturowe wskazują na istotny wpływ nanocząstek na strukturę i właściwości użytkowe kompozytu, takie jak: odporność na procesy tarcia i zużycia oraz uwalniania fluoru, zachodzące w jamie ustnej po założeniu przez lekarza materiału stomatologicznego [3-4]. W porównaniu do powszechnie stosowanych makro- i mikrocząstek, nanocząstki cechują się równomiernym rozproszeniem w żywicy w skali nano. Dzięki temu nanokompozyty charakteryzuje większa twardość i odporność na zużycie [5-9]. W przypadku kompozytów stomatologicznych wykorzystywanym nanoproszkiem jest głównie silanizowana nanokrzemionka. Stosowana obok powszechnie używanych napelniaczy proszkowych [10-12] wpływa na obniżenie współczynnika tarcia i zużycie materiału.

Obok właściwości tribologicznych, istotną cechą materiału stomatologicznego jest emisja fluoru [13-15]. Fluor dostarczany jest do stomatologicznego materiału kompozytowego w postaci fluorowanego szkła bądź czystych związków, takich jak YbF_3 i YF_3 . Jednak z uwagi na nowatorskie podejście do tego zagadnienia, nie ma zbyt wielu doniesień literaturowych na ten temat. Celem niniejszej pracy było określenie wpływu nanokrzemionki na procesy tarcia i uwalniania fluoru przez kompozytowe materiały stomatologiczne.

Materiał i metody badań

W niniejszej pracy badaniom tribologicznym poddano pięć kompozytów ceramiczno-polimerowych. Składały się one w 40%obj. z osnowy polimerowej oraz w 60%obj. z nieorganicznych napelniaczy. Napelniacze nieorganiczne sta-

TRIBOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF MATERIALS FOR DENTAL RESINS

JOANNA ROMANIUK, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA,
KRZYSZTOF J. KURZYDŁOWSKI, JAN R. DĄBROWSKI

Abstract

The paper presents results of research on friction and fluorine release from composite dental materials. Influence of powder fillers in form of nanosilica and of ceramic glass on friction coefficient and the kind of wear of the composite material was evaluated. Wear of the examined materials was determined using gravimetric method. Kinetics of fluorine release from composites with various content of filler in form of fluorinated glass was also investigated.

Key words: Friction, wear, fluorine release, nanosilica, ceramics

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),178-181]

Introduction

Dental composite materials consist of polymer matrix and powder fillers. Improvement of adhesion of inorganic glass to organic resin is achieved through silanization process. The used silane, due to its hydrophobic properties, decreases also water sorption of composites, and its low reactivity brings about a decrease of material's polymerization shrinkage [1]. Properties of the composite material depend chiefly on the kind, size, shape and hardness of fillers particles [2]. The latest literature data indicate a significant influence of nanoparticles on structure and utilization properties of composite, such as: resistance to friction, wear and fluorine release processes occurring in the oral cavity after application of dental material [3-4]. In comparison to commonly used macro- and microparticles, nanoparticles are characterized by uniform dispersion in resin at nano scale. Due to that, nanocomposites are characterized by higher hardness and wear resistance [5-9]. In the case of dental composites, the used nanopowder is mainly nanosilica. Applied next to commonly used powder fillers [10-12], it effects in a decrease of friction coefficient and material wear coefficient.

Except for tribological properties, a significant characteristic of the dental material is fluorine emission [13-15]. fluorine is provided for the dental composite material in form of fluorinated glass or pure compounds, such as YbF_3 and YF_3 . However, due to an innovative approach to this problem, there is little literature data. The aim of this paper was determination of the influence of nanosilica on processes of friction and fluorine release by dental composite materials.

Materials and research methods

In this paper, tribological tests were performed on five ceramic-polymer composites. They consisted in 40%vol. of polymer matrix and in 60%vol. of inorganic fillers. The inorganic filler consisted of silanized glass with the following symbol and oxide composition: K4M ($\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-BaO-SrO-Na}_2\text{O-F}$) and nanosilica (n-SiO₂ symbol R709) in the amount of 5, 10 or 15%w. The examined composites were marked with symbols A-E, and their composition was pre-

nowiły silanizowane szkło o następującym symbolu i składzie tlenków: K4M ($\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-BaO-SrO-Na}_2\text{O-F}$) oraz silanizowana nanokrzemionka (n- SiO_2 , symbolu R709) w ilości 5, 10 lub 15% wag. Badane kompozyty oznaczono symbolami A-E, a ich skład przedstawiono w TABELI 1. Ostatnia cyfra w symbolu szkła określa średnią wielkość jego cząstek.

Badania tarciove przeprowadzono przy użyciu pneumatycznie sterowanego testera tribologicznego typu pin-on-disc, przy następujących parametrach procesu: siła tarcia - 1, 5, 10MPa; czas tarcia - 3 godz., częstotliwość: 1,5Hz, droga tarcia: 2,5 mm. Próbką w eksperymencie były wytworzone kompozyty ceramiczno-polimerowe, zaś przeciwpróbką płytka ze stali hartowanej. Proces tarcia wykonano w środowisku buforu fosforanowego o pH=6,8, odpowiadającym pH śliny. Zużycie oceniano metodą wagową, w której wykorzystano wagę typu XS205 Dual Range firmy METTLER TOLEDO z dokładnością do 0,01mg. Badano również chropowatość powierzchni przeciwpróbki przy użyciu urządzenia Talysurf 10 firmy Taylor Hobson. Po procesach tarcia powierzchnie próbek kompozytowych obserwowano za pomocą mikroskopu skaningowego Hitachi S 3000N z przystawką do mikroanalizy rentgenowskiej.

Badania uwalniania fluoru wykonano dla dwóch materiałów: kompozytu E zawierającego 60% szkła K4M5 oraz kompozytu B, w skład którego obok szkła weszła nanokrzemionka. Do oznaczania zawartości jonów fluorkowych uwalnianych z badanych materiałów użyto metodę potencjometrii bezpośredniej z kombinowaną elektrodą fluorkową firmy ORION. Badania przeprowadzono po 1, 4, 7, 14, 30 i 60 dniach przetrzymywania próbek w roztworze kontaktowym. Każdorazowo do badań wykorzystywano po 3 roztwory z próbkami danego materiału.

Wyniki badań

Analizę wyników badań tribologicznych przeprowadzono w oparciu o dwa parametry: (1) współczynnik tarcia oraz (2) zużycie. Pomiary współczynnika tarcia (RYS.1) wskazują, że zależy on od ilości nanokrzemionki i obciążenia działającego na próbkę. Stwierdzono także, że zużycie kompozytu (RYS.2) silnie zależy od jego składu, a w szczególności od dodatku nanokrzemionki i jest najmniejsze dla kompozytu B zawierającego jej 10%. Może to wynikać z faktu uzyskania dla tej zawartości nanokrzemionki równomiernego rozłożenia cząstek w strukturze kompozytu i utworzenia struktury hybrydowej. Dla większych zawartości nanokrzemionki możliwe jest powstanie jej aglomeratów w strukturze kompozytu [16], co w oczywisty sposób obniża jego właściwości. Badania te pokazały także niekorzystny wpływ zmniejszenia wielkości cząstek szkła na zużycie kompozytu. Kompozyty B i C zawierają 10% nanokrzemionki i 50% szkła o różnych wielkościach cząstek, a wykazują największe zróżnicowanie pod względem zużycia.

Obserwacje za pomocą mikroskopu skaningowego (Rys. 3) próbek po procesach tarcia posłużyły do określenia rodzaju zużycia materiału. We wszystkich przypadkach widać postępującą delaminację powierzchni materiału z elementami zużycia ściernego. Największa destrukcja materiału występuje w przypadku kompozytu na bazie szkła, którego średnia wielkość cząstek wynosi $3\mu\text{m}$. Nieco mniejsze zniszczenia obserwuje się dla kompozytu zawierającego cząstki szkła o średniej wielkości $5\mu\text{m}$. Oznacza to, że wielkość cząstek napelniaaczy proszkowych obok dodatku nanokrzemionki jest jednym z czynników decydujących o odporności na zużycie przez tarcie kompozytów ceramiczno-polimerowych przeznaczonych na stałe wypełnienia stomatologiczne. Badania chropowatości przeciwpróbek po

Kompozyt Composite	Szkło ceramiczne Ceramic glass (%obj.)	Nanokrzemionka Nanosilica (%obj.)
A	45%K4M5	15% R709
B	50%K4M5	10%R709
C	50%K4M3	10%R709
D	55%K4M5	5%R709
E	60%K4M5	-

TABELA 1. Skład kompozytów.

TABLE 1. Composition of composites.

sented in TABLE 1. The last symbol's number determine the average size of particles in mm.

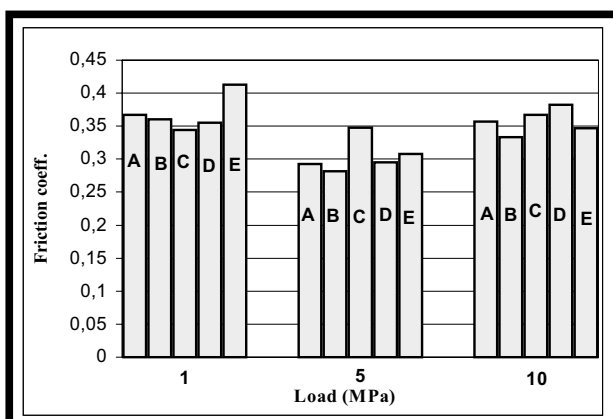
Friction tests were carried out using pneumatic-steered pin-on-disc tribological tester, at the following process parameters: friction force - 1, 5, 10MPa; friction time - 3 hours, frequency - 1,5 Hz, friction path - 2,5 mm. The tested sample was the fabricated ceramic-polymer composites, and the counter sample - a hardened steel plate. Friction process was performed in phosphate buffer environment with pH=6,8 corresponding to pH of saliva. Wear was evaluated using gravimetric method, where scales type XS205 Dual Range, manufactured by METTLER TOLEDO, with precision to 0,01mg was used. Surface roughness of the counter sample was also examined using Talysurf 10 appliance, manufactured by Taylor Hobson. After the friction processes, the surfaces of composite samples were observed using scanning microscope Hitachi S 3000N with an attachment for X-ray microanalysis.

Examinations of fluorine release were performed for two materials: composite E with 60% glass K4M content and composite B, consisting of glass and nanosilica. For the purpose of determination of the content of fluoride ions released from the examined materials, method of direct potentiometry with combined fluoride electrode, manufactured by Orion, was used. The tests were performed after 1, 4, 7, 14, 30, and 60 days of keeping the samples in agent solution. Each time 3 solutions with samples of given material were used.

Results

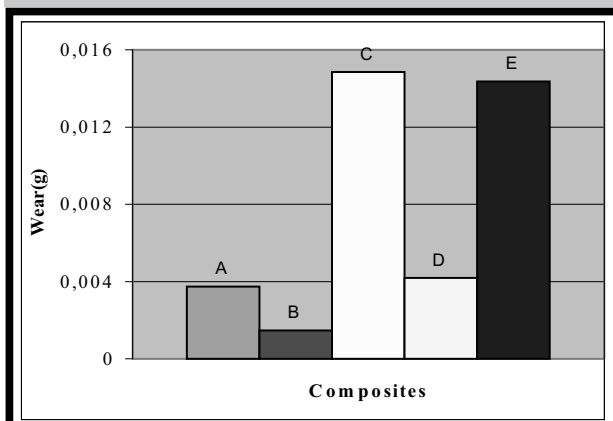
The analysis of tribological tests' results was carried out basing on two parameters: (1) friction coefficient and (2) wear. Measurements of friction coefficient (FIG.1) show that it depends on nanosilica amount and loading on sample. It was also determined that wear of the composite (FIG.2) strongly depends on its composition, and especially on the addition of nanosilica, and it is the lowest for composite B containing 10% of it. This can result from the fact of achieving, for this content of nanosilica, of uniform distribution of particles in composite's structure and forming of hybrid structure. For higher contents of nanosilica, forming of its agglomerates in composite's structure [16] is possible, which obviously decreases the properties of the composite. The research showed also the negative influence of decrease in glass particles size on composite's wear. Composites B and C contain 10% of nanosilica and 50% of glass with various particle sizes and show the highest diversity regarding wear.

Scanning microscope observations (FIG.3) of samples after friction processes were used for determination of the kind of material wear. In all of the cases, progressive delamination of the material's surface with elements of attrition is visible. The largest destruction of the material occurs in the case of glass based composite with average



RYS. 1. Zmiana wsp. tarcia w zależności od obciążenia.

FIG. 1. Change in friction coefficient depending on loading.



RYS. 2. Zużycie poszczególnych kompozytów przy obciążeniu 10 MPa.

FIG. 2. Wear of particular composites at 10 MPa loading.

kontakcie z różnymi kompozytami poddany procesowi tarcia nie ujawniają zasadniczych różnic między materiałami i utrzymują się na poziomie $0,1\mu\text{m}$.

RYS.4 przedstawia emisję jonów fluorkowych z dwóch badanych kompozytów E i B. Wzrost ilości uwolnionych do roztworu jonów fluorkowych z obu kompozytów rozpoczyna się w 7 dobie i trwa do 30 dnia. Dalszy wzrost czasu ekspozycji kompozytu w roztworze nie wpływa na zwiększenie ilości uwolnionego fluorku. Może to oznaczać, iż cały fluor z napełniacza uwolnił się do roztworu. Należy zwrócić uwagę, że ilość uwolnionego fluorku jest wyższa dla kompozytu bez nanokrzemionki, co wynika z większej zawartości szkła K4M, z którego następuje uwalnianie jonów fluorku.

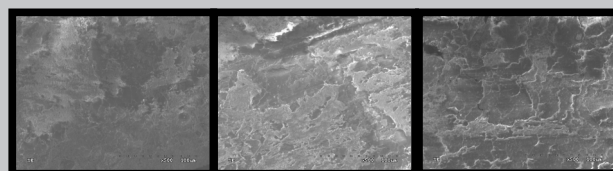
Podsumowanie

W pracy określono charakterystyki tribologiczne i fizykochemiczne materiałów kompozytowych na bazie żywicy Bis-GMA z dwoma rodzajami szkła fluorowanego, różniącego się wielkością cząstek. Na podstawie wykonanych badań sformułowano następujące wnioski:

- Zużycie przez tarcie kompozytów ceramiczno-polimerowych przeznaczonych na stałe wypełnienia stomatologiczne zależy od wielkości cząstek wypełniacza szklanego oraz od zawartości nanokrzemionki.

Dodatek nanokrzemionki zmniejsza także współczynnik tarcia kompozytu. Najniższe wartości współczynnika występują przy dodatku 10%obj. n-SiO_2 .

- Najniższe wartości współczynnika tarcia badanych kom-



RYS. 3. Powierzchnie kompozytów po tarcu przy obciążeniu 10MPa: a) próbka E; b) próbka B; c) próbka C

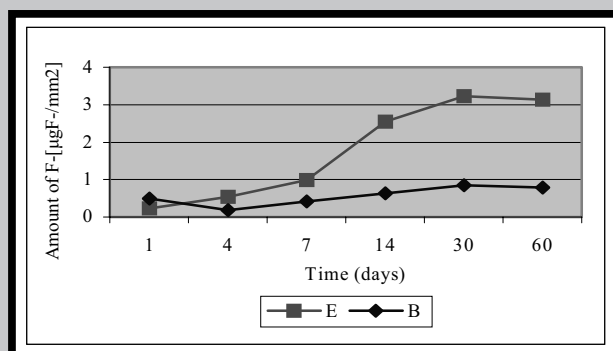
FIG. 3. Composite surfaces after friction at 10MPa loading: a) sample E; b) sample B; c) sample C.

particle size equal $3\mu\text{m}$. Slightly smaller damages are observed for the composite containing glass particles with average size of $5\mu\text{m}$. That means that the size of particles of powder fillers, besides the nanosilica addition, is one of the factors determining the resistance to friction wear of ceramic-polymer composites for dental resins. Roughness tests of counter samples after contact with different composites subjected to friction process reveal no significant differences between materials and sustain a level of $0,1\mu\text{m}$. FIG.4 presents fluoride ions emission from two examined composites E and B. An increase in the amount of released to solution fluoride ions from both composites begins in the 7th day and lasts till the 30th day. Further increase of the exposition time of the composite in the solution does not effect in an increase of the amount of the released fluorine. This can mean that all fluorine from the filler was released to the solution. It should be noted, that the amount of released fluorine is higher for the composite without nanosilica, which results from higher glass K4M content, from which fluorine ions are released.

Summary

In the paper, tribological and physico-mechanical characteristics of Bis-GMA resin-based composite materials with two kind of fluorinated glass varying in particles' size. On the basis of the performed examinations, the following conclusions have been formed:

- Friction wear of ceramic-polymer composites for dental resins depends on the size of glass filler particles and nanosilica content.
- Nanosilica addition also reduces the friction coefficient of the composite. The lowest values of the coefficient occur at 10% vol. addition of n-SiO_2 .
- The lowest values of friction coefficient for the examined composites occur at 5 MPa loading. An increase of loading brings about an increase in friction and wear coefficients.
- Significant emission of fluoride ions from the analyzed composites begins after 7 days of examinations and for the



RYS. 4. Ilość uwolnionego fluorku z kompozytów B i E.

FIG. 4. Amount of fluorine released from composites B and E.

pozytów występują przy obciążeniu 5MPa. Zwiększenie obciążenia powoduje zwiększenie współczynnika tarcia i zużycia.

Znacząca emisja jonów fluorkowych z analizowanych kompozytów rozpoczyna się po 7 dobach badania i dla kompozytu zawierającego 60% szkła wzrasta do poziomu $3\mu\text{g F-}$ z 1mm^2 próbki.

Zaproponowane w tej pracy kompozyty mogą stanowić przyszłe materiały na stałe wypełnienia stomatologiczne. Jednak w celu wprowadzenia ich na rynek stomatologiczny istnieje potrzeba przeprowadzenia dalszych badań, w szczególności biologicznych i klinicznych.

Podziękowania

Praca badawcza sfinansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji jako zadanie badawcze zamawiane 21/PBZ-KBN-082/T08/2002.

Piśmiennictwo

- [1] Wilson K.S., Zhang K., Antonucci J.M.: Systematic variation of interfacial phase reactivity in dental nanocomposites, *Biomaterials*, 26, 2005, 5095-5103.
- [2] Heintze S.D., Zappini G., Rousson V.: Wear of ten dental restorative materials in five wear simulators results of a round robin test, *Dental Materials*, 21, 2005, 304-317.
- [3] Antunes P.V., Ramalho A.: Study of abrasive resistance of composites for dental restoration by ball-cratering, *Wear*, 255, 2003, 990-998.
- [4] Shortall A.C.: Xiao Q.H., Marquis P.M.: Potential countersample materials for in vitro simulation wear testing, *Dental Materials*, 18, 2002, 246-254.
- [5] Klapdohr S., Moszner N.: New inorganic components for dental filling composites, *Monatshefte für Chemie*, 136, 2005, 21-45.
- [6] Zhang M.Q., Rong M.Z., Yu S.L., Wetzel B., Friedrich K.: Effect of particle surface treatment on the tribological performance of epoxy based nanocomposites, *Wear*, 253, 2002, 1086-1093.
- [7] Xing X.S., Li R.K.Y.: Wear behaviour of epoxy matrix composites filled with uniform sized sub-micron silica particles, *Wear*, 256, 2004, 21-26.
- [8] Xu H.H.K.: Quinn J.B., Giuseppetti A.A., Eichmiller F.C., Parry E.E., Schumacher G.E.: Three-body wear of dental resin composites reinforced with silica-fused whiskers, *Dental Materials*, 20, 2004, 220-227.

KIERUNKI ROZWOJU MATERIAŁÓW KOMPOZYTO- WYCH NA WYPEŁNIENIA STAŁE JAKO ALTERNATYWY AMALGAMÓW STOMATOLOGICZNYCH

STANISŁAW RYMKIEWICZ, BEATA ŚWIECZKO-ŻUREK

POLITECHNIKA GDAŃSKA, WYDZIAŁ MECHANICZNY,
KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ
UL. G. NARUTOWICZA 11/12, 80-952 GDAŃSK,
SRYMKIEW@PG.GDA.PL

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),181-183]

Wprowadzenie

Przez wiele lat istotnym problemem było stworzenie takiego materiału do wypełnień ubytków w zębach, który trwale łączyłby się z tkanką zęba, był odporny na nacisk, zużycie i

composite containing 60% of glass it increases to a level of $3\mu\text{g F-}$ from 1mm^2 sample.

The composites proposed in this paper can constitute future materials for dental resins. However, in order to introduce them to the stomatological market, further research, especially biological and clinical, must be conducted.

Acknowledgements

Research work financed by the Minister of Science and Information Society Technologies as an ordered research task 21/PBZ-KBN-082/T08/2002.

References

- [9] Wetzel B., Hauptert F., Friedrich K., Zhang M.Q., Rong M.Z.: Impact and wear resistance of polymer nanocomposites at low filler content, *Polymer Engineering and Science*, 9, 2002, 1919-1927.
- [10] Mandikos M.N., McGivney G.P., Davis E., Bush P.J., Carter M.: A comparison of the wear resistance and hardness of indirect composite resins, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 85, 4, 2001, 386-395.
- [11] Luo J., Lannutti J.J., Seghi R.R.: Effect of filler porosity on the abrasion resistance of nanoporous silica gel/polymer composites, *Dental Materials*, 14, 1998, 29-36.
- [12] Nagarajan V.S., Jahanmir S., Thompson V.P.: In vitro wear of dental composites, *Dental Materials*, 20, 2004, 63-71.
- [13] Vermeersch G., Leloup G., Vreven J.: Fluoride release from glass-ionomer cements, compomers and resin composites, *Journal of Oral Rehabilitation*, 28, 2001, 26-32.
- [14] Itota T., Carrick T.E., Yoshiyama M., McCabe J.F.: Fluoride release and recharge in giomer, compomer and resin composite, *Dental Materials*, 20, 2004, 789-795.
- [15] Furtos G., Cosma V., Prejmorean C., Moldovan M., Brie M., Colceriu A., Vezsenyi L., Silaghi-Dumitrescu, Sirbu C.: Fluoride release from dental resin composites, *Materials Science and Engineering C*, 25, 2005, 231-236.
- [16] M. Andrzejczuk, M. Lewandowska, K.J. Kurzydłowski: "Właściwości mechaniczne światłoutwardzalnych kompozytów zbrojonych mikro- i nanocząstkami" *Kompozyty*, 5, 2005, 75-78.

THE DEVELOPMENT OF MATRIX COMPOSITES INTENDED FOR STEADY FILLINGS AS ALTERNATIVES OF DENTISTRY AMALGAMS

STANISŁAW RYMKIEWICZ, BEATA ŚWIECZKO-ŻUREK

GDANSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, MECHANICAL DEPARTMENT,
FACULTY OF MATERIAL ENGINEERING
UL. G. NARUTOWICZA 11/12, 80-952 GDAŃSK,
SRYMKIEW@PG.GDA.PL

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),181-183]

Introduction

For many years it was vital to create a substance to fill the tooth holes, which would join the tooth tissues permanently, resistible to pressure, material consumption and

181

ścieranie. Najpowszechniej stosowane były wypełnienia amalgamatowe. Obecnie jednak wypierane są przez plomby kompozytowe.

Materiały amalgamatowe

Amalgamat stomatologiczny powstaje, gdy mieszany jest stop srebra z rtęcią. W skład stopu wchodzi Ag, Sn i Cu w formie drobnych cząstek Ag_3Sn i Ag-Sn . Dawniej w amalgamatach (ortęciach) niskomiedziowych dochodziło do powstawania produktu cynowo-rtęciowego, nazywanego fazą γ_2 (Sn_{7-8}Hg o strukturze heksagonalnej). Obecnie w amalgamatach wysoko miedziowych faza γ_2 została wyeliminowana, dzięki czemu wzrosła odporność na korozję i pęknięcia brzeżne [1]. Aby ograniczyć wydzielania rtęci z amalgamatu w trakcie wiązania, wprowadzono stop rtęciowo-indowy zamiast czystej rtęci. Jako amalgamaty wolne od rtęci określa się amalgamaty zawierające gal zamiast rtęci. Jednak nie stosuje się ich zbyt często, ponieważ są mniej odporne na korozję niż amalgamaty wysokomiedziowe z rtęcią [1].

Właściwości współczesnych amalgamatów przedstawiono w TABELI 1 [2].

Obecnie stosuje się praktycznie wyłącznie amalgamaty w formie kapsułkowej. Zarówno proszek srebra, jak i rtęć pakowane są do małych zgrzewanych pojemników i umieszcza w jednorazowych kapsułkach [1,3,4]. Plomby z tego stopu wykorzystuje się powszechnie, ale ze względów kosmetycznych nie używa się ich do zębów przednich.

Rozwój materiałów kompozytowych

Kompozyty stanowią estetyczną alternatywę dla amalgamatów. Mają one strukturę podobną do tkanki zęba, zawierają bowiem substancję organiczną (żywica) i nieorganiczną (wypełniacze) połączone substancją wiążącą (silan winylu). Tradycyjne kompozyty z makrowypełniaczem zostały wyparte przez materiały z mikrowypełniaczem oraz o jeszcze lepszych właściwościach materiały mikrohybrydowe. Właściwości tych kompozytów przedstawiono w TABELI 2 [5].

Prym w dziedzinie najnowszych materiałów na wypełnienia stomatologiczne wiodą nanokompozyty. Materiały te zawierają w sobie nanocząstki (RYS.1), które otrzymywane są z różnych komponentów, np. metodą zol-żel. Dzięki kontrolowaniu procesu można go zakończyć w dowolnym momencie, co daje możliwość uzyskania cząstek o wielkości rzędu 20 nm.

Cząstki te posiadają całkiem nowe właściwości w zestawieniu z cząstkami konwencjonalnymi. Materiał z nanowypełniaczem posiada najmniejszy skurcz polimeryzacyjny z dotychczas znanych materiałów na wypełnienia. Jest to bardzo ważna zależność, która w istotny sposób wpływa na jakość i trwałość wypełnienia. Dodatkowym atutem nanocząstek jest fakt, iż nie powodują one załamania światła ze względu na swoją wielkość. Ta wspaniała translucencja daje bardzo dobre walory estetyczne.

Podsumowanie

Kierunki rozwoju wskazują jednoznacznie na doskonalenie materiałów kompozytowych, w tym poprzez stosowanie nanowypełnień, które redukując udział żywicy w materiale kompozytowym, a zwiększając zawartość wypełnienia, zmniejszają w znacznym stopniu skurcz polimeryzacyjny.

Kompozyty posiadają wiele interesujących możliwości, a ich trwałość i estetyczny wygląd oraz łatwość pracy z nimi spr-

grinding. The amalgams filling were most commonly used. Nowadays, matrix composites fillings are becoming popular.

Amalgam materials

The dentistry amalgam is made by mixing silver and mercury alloys. The alloy includes Ag, Sn and Cu as small particles Ag_3Sn and Ag-Sn . When low-copper amalgams came in dentistry use, the tin-mercury product called phase γ_2 was formed (Sn_{7-8}Hg). At present in high-copper amalgams the phase γ_2 was eliminated, owing to it the amalgams are more resistible to corrosion and cracking [1]. To reduce the amount of mercury, which gets out of amalgam while filling a tooth, mercury-indium alloy is used instead of pure mercury. The amalgams containing gallium instead of mercury are called mercury free amalgams. They are less resistible to corrosion than high-mercury ones and for that reasons they are less-frequently use [1].

The properties of contemporary amalgams are shown in TABLE 1 [2].

Cecha Properties	Typ amalgamatu The amalgams type		
	Nisko- miedziowy (cząsteczki nieregularne) Low- copper (irregular molecules)	Wysoko- miedziowy (cząsteczki mieszane) High-copper (mixed molecules)	Wysoko- miedziowy (cząsteczki kuliste) High- copper (spherical molecules)
Wytrzymałość na rozciąganie Tensile strength [MPa]	52	50	54
Wytrzymałość na ścislenie po 30 min Compressive strength after 30 min [MPa]	53	67	111
Wytrzymałość na ścislenie po 1 godz. Compressive strength after 1 h [MPa]	89	109	188
Wytrzymałość na ścislenie po 1 dniu Compressive strength after 1 day [MPa]	430	402	451
Płynięcie Flow [%]	2,05	0,44	0,15
Zmiana wymiarów po 24 godz. The dimension changes after 24 h [μm/cm]	8	-3	-5
Twardość w skali Knoppa The Knopp hardness [kg/mm.]	146	143	166

TABELA 1.
TABLE 1.

Nowadays, the amalgams are used in capsule forms. Also the silver powder and mercury are packed into little banding containers and put in single capsules [1,3,4]. Generally the fillings from this alloy are used, but not to the front teeth, because of the visual reasons.

The matrix composites

The matrix composites are the esthetical alternative of dentistry amalgams. They have the structure similar to the tooth tissue, they contain organic matter (resin) and mineral matter (fillings), which are connected with fix matter (silicomethane vinyl). The matrix composites with macro fillings were removed by the matrix composites with micro fillings and micro hybrid materials of better properties. The properties of the matrix composites are shown in TABLE 2 [5].

Nano-composites are the most popular materials for fillings. The materials contain nano-molecules (FIG.1), which are made from different components as: sol-gel method. You can finish the process in optional moment, which gives the

Cecha Properties	Kompozyt z mikrowypełniaczem Matrix composites with micro fillings	Kompozyty mikrohybrydowe Micro hybrid matrix composites
Skurcz polimeryzacji Polymerisation contraction [%]	2-3	1,0-1,7
Przewodnictwo cieplne Heat conduction (10^{-4} cal/s/cm ² [sC/cm])	12-15	25-30
Liniowy współczynnik ekspansji termicznej The linear factor of thermal expansion [10^{-6} /sC]	55-68	25-28
Sorpcja wody The water sorption (mg/cm ²)	1,2-2,2	0,3-0,6
Kontrastowość w obrazie RTG The RTG contrast [mm Al.]	-	2,7-5,7
Wytrzymałość na ściskanie Compressive strength [Mpa]	230-290	200-340
Wytrzymałość na rozciąganie Tensile strength [Mpa]	26-33	34-62
Wytrzymałość na zginanie Bending strength [Mpa]	-	90-140
Moduł elastyczności podczas ściskania Bending strength during the compressive [Gpa]	3,0-5,0	8,0-14
Moduł elastyczności The flexibility module (GPa)	-	5-18
Twardość w skali Knoopa The Knoop hardness [kg/mm ²]	22-36	55-80
Wytrzymałość połączenia ze szklivem i zębino zastosowa- niu czynnika wiążącego The connexion strength of tooth tissue after adapted fix factor [Mpa]	14-30	14-30

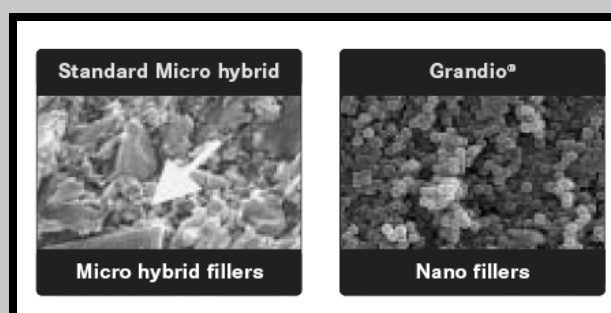
TABELA 2.
TABLE 2.

wiają, że są preferowane przez lekarzy i pacjentów. Jedyny niepokój budzić może możliwość uwalniania się podczas wiązania tych preparatów frakcji żywicy, co może prowadzić do pojawienia się reakcji alergicznych.

Amalgamaty pozostają w niektórych sytuacjach wypełnieniem z wyboru, zapewniającym bardzo wysoką trwałość i niezmienną jakość. Współczesne systemy łączące materiały kompozytowe ze szklivem i zębino pozwalają na doskonałe połączenie kompozytu i tkanek zęba, chronią też miazgę przed przenikaniem drobnoustrojów.

Piśmiennictwo

- [1] Craig R.G., Powers J.M., Wataha J.C.: The dentistry materials. Editing: H.Limanowska-Shaw, Urban & Partner, Wrocław, 2000.
- [2] Symonowicz R.: The dentistry amalgams. The temporary work. Gdansk University of Technology, Mechanical Department, Gdańsk 2004.
- [3] Jakubiak M.: Biomaterials for dentistry fillings - the properties. The diploma. Gdansk University of Technology, Mechanical Department, Gdańsk, 2005.



RYS. 1. Wielkość i kształt wypełnienia mikrohybrydowego (lewy) oraz nanowypełnienia (prawy) [6].

FIG. 1. The largeness and shapes of micro-hybrid filling (left) and nano-filling (right) [6].

possibility for getting molecules of 20 nm.

The molecules have new properties. The material with nano-filling has lower polymerisation contraction than the other filling materials. This is very important dependence for the quality and the durability of the fillings. They also do not make the light refraction, because of their largeness. They give a very good visual value.

Summary

The development shows that matrix composite, especially nano-fillings, by reducing the resin and the polymerisation contraction, makes high the fillings. The matrix composites have a lot of interesting possibility, their durability and aesthetic appearance makes them preferred by doctors and patients. The one thing, which could make anxiety, is the possibilities of setting free the resin during bonding this preparation. This situation may contribute to allergy reaction.

The only alternative filling is amalgams, which assure very good durability and quality. Contemporary matrix composites join the tooth tissue and protect from microbes.

References

- [4] www.corrosion-doctors.org/Implants/amalgam.htm.
- [5] Wierciński P.: Aesthetic materials for dentistry. The temporary work. Gdansk University of Technology, Mechanical Department, Gdańsk 2004.
- [6] www.dentsply.pl, www.safina.cz, www.3m.com, www.kerr-dental.com, www.heraeus-kulzer.de, www.degussa.com, www.vivadent.com, www.voco.de.

BADANIA DEGRADACJI KOMPOZYTÓW CERAMICZNO - POLIMEROWYCH STOSOWA- NYCH NA STAŁE WYPEŁNIENIA STOMATOLOGICZNE

JOANNA SIEJKA - KULCZYK, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA,
KRZYSZTOF JAN KURZYDŁOWSKI

POLITECHNIKA WARSZAWSKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ
02 - 507 WARSZAWA, UL. WOŁOSKA 141
JSIEJKA@INMAT.PW.EDU.PL

Streszczenie

Celem badań była ocena trwałości kompozytów ceramika - polimer stosowanych jako stałe wypełnienia stomatologiczne. Do badań wykorzystano materiały wytworzone na Wydziale Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej we współpracy z Wydziałem Chemicznym Politechniki Warszawskiej, Instytutem Szkła i Ceramiki w Warszawie oraz Wydziałem Mechanicznym Politechniki Białostockiej. W celu oceny stopnia degradacji materiałów próbki poddano ekspozycji w roztworze 0,1M NaOH przez: 6h, 24h oraz 7 dni. Stopień degradacji oceniano, mierząc wytrzymałość na zginanie i mikrotwardość HV0,2. Próbie zginania przeprowadzono na maszynie MTS, a mikrotwardość mierzono przy użyciu twardościomierza Zwick. Jako miarę degradacji badanych materiałów przyjęto spadek właściwości mechanicznych w stosunku do stanu wyjściowego (materiały nie poddane działaniu roztworu NaOH).

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),184-186]

Wprowadzenie

Jednymi z najpopularniejszych materiałów, stosowanych obecnie na stałe wypełnienia stomatologiczne są kompozyty ceramiczno - polimerowe, które wypierają amalgamat, ze względu na toksyczność rtęci. Ważnym aspektem eksploatacyjnym wypełnień stomatologicznych jest ich trwałość i niezmiennosc właściwości w środowisku jamy ustnej. Degradacja kompozytów dentystycznych zachodzi szczególnie szybko w środowisku zasadowym na skutek oddziaływania z jonami OH⁻ i związana jest z hydrolizą połączeń silanowych i rozpuszczaniem wypełniacza [1]. Proces ten jest również bardzo powolny w wodzie, sztucznej ślinie oraz w środowisku o niskim pH. W przypadku wypełnień w jamie ustnej, tego typu degradacji nie obserwuje się przez rok, a nawet dłużej. Wzrost pH powoduje przyspieszenie reakcji [2]. W związku z tym w pracy, w celu symulacji degradacji badane materiały przetrzymywano w 0,1M NaOH, w którym proces ten ma charakter przyspieszony.

Metodyka badań

W badaniach wykorzystano kompozyty na bazie żywicy bis - GMA z różnymi rodzajami wypełniaczy, o różnym składzie chemicznym i rozkładzie ziarnistym. Materiały zostały zaprojektowane i wytworzone na Wydziale Inżynierii Materiałowej Politechniki Warszawskiej. Całkowity udział objętościowy wypełniacza stanowił 60% i składał się ze szkła o średniej wielkości cząstek ~ 3 i 5μm oraz nano - krzemionki o średniej wielkości cząstek 40 nm. Udział objętościowy

DEGRADATION PROCESSES IN CERAMIC-POLYMER COMPOSITES USED FOR DENTAL FILLINGS

JOANNA SIEJKA - KULCZYK, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA,
KRZYSZTOF JAN KURZYDŁOWSKI

WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING
02 - 507 WARSAW, WOŁOSKA ST. 141
JSIEJKA@INMAT.PW.EDU.PL

Abstract

The objective of the research was an evaluation of durability of ceramic - polymer composites used for dental fillings. In the investigations, materials fabricated at the Faculty of Materials Science and Engineering of Warsaw University of Technology in cooperation with the Faculty of Chemistry of Warsaw University of Technology, Institute of Glass and Ceramics in Warsaw and the Faculty of Mechanics of Białystok Technical University were used. In order to evaluate the material's degradation degree, specimens were subjected to exposition in a 0,1M NaOH solution for: 6h, 24h, and 7 days. The degree of degradation was evaluated by measuring flexural strength and microhardness HV0,2. The bend test was performed on a MTS machine, and microhardness was measured using a Zwick hardness tester. As a measure of degradation of the examined materials, a decrease in mechanical properties compared to the initial state (materials not subjected to exposition in NaOH solution) was determined.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),184-186]

Introduction

The most popular materials currently used for dental resins are ceramic-polymer composites, which supplanted amalgam due to the toxicity of mercury. An important exploitation aspect of dental resins is their durability and properties' stability in the environment of the oral fissure. Degradation of dental composites proceeds especially fast in a basic environment due to reaction with OH⁻ ions, and is connected with hydrolysis of silane couplings and dissolution of the filler [1]. This process is also very slow in water, artificial saliva and a low pH environment. In the case of dental resins in an oral fissure, degradation of such type is not observed for a year or even longer. An increase of pH brings about acceleration of the reaction [2]. Due to this, in this work, in order to simulate degradation, the examined materials were kept in 0,1M NaOH, in which this process has an accelerated character.

Research methodology

In the investigations, bis - GMA resin based composites with various kinds of fillers of various chemical composition and grain distribution were used. The materials were designed and fabricated at the Faculty of Materials Science and Engineering of Warsaw University of Technology. The total percentage by volume of the filler amounted to 60% and it consisted of glass with the average particle size ~ 3 and 5μm and of nano - silica with the average particle size

nano - krzemionki wahał się od 0 do 20% objętościowo. Zastosowane rodzaje proszków wraz z ich składem chemicznym przedstawiono w TABELI 1. W TABELI 2 natomiast zestawiono wytworzone materiały.

Próbki przetrzymywano w 0,1M NaOH przez 6h, 24h, 144h. Następnie mierzono wytrzymałość na zginanie i mikrotwardość. Zmierzone właściwości mechaniczne porównywano ze stanem wyjściowym. Stan wyjściowy stanowiły właściwości próbek mierzone tydzień po utwardzeniu. Jako miarę degradacji przyjęto procentowy spadek właściwości mechanicznych, wyznaczany z następującej zależności:

$$s = (w_p - w_k) * 100 / w_p \quad [\%],$$

gdzie:

s - spadek właściwości

w_p - wartość początkowa

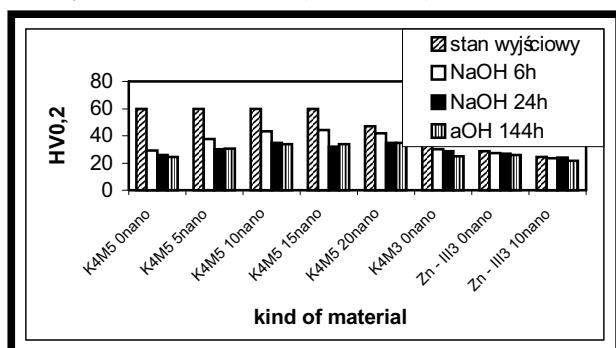
w_k - wartość po 144h w 0,1M NaOH

Osnowa Base	Symbol szkła Glass symbol	Średnia wielkość cząstek wypełniacza Average size of filler particles [μm]	Udział objętościowy nanokrzemionki Volume percentage of nano-silica [%]
Bis - GMA	K4M	3,203	0
Bis - GMA	K4M	5,113	0
Bis - GMA	K4M	5,113	5
Bis - GMA	K4M	5,113	10
Bis - GMA	K4M	5,113	15
Bis - GMA	K4M	5,113	20
Bis - GMA	III - Zn	2,998	0
Bis - GMA	III - Zn	2,998	10

TABELA 2. Rodzaje wytworzonych materiałów.
TABLE 2. Kinds of fabricated materials

Wyniki badań

Wartości mikrotwardości HV0,2 oraz wytrzymałości na zginanie, zmierzone po różnym czasie ekspozycji w 0,1M NaOH dla poszczególnych kompozytów przedstawiono odpowiednio na RYSUNKACH 1 i 2. Największy spadek mikrotwardości HV0,2 zaobserwowano dla materiałów z 60% wypełniacza K4M o średniej wielkości cząstek ~5 oraz ~3 mm (RYS.3). Należy jednak zaznaczyć, że kompozyt z proszkiem K4M5 charakteryzował się najwyższą mikrotwardością w stanie wyjściowym (HV0,2 = 60). Najmniejszy spa-



RYS. 1. Mikrotwardość HV0,2 badanych materiałów w stanie wyjściowym i po różnych czasach ekspozycji w NaOH.

FIG. 1. Microhardness HV0,2 of the examined materials in the initial state and after different times of exposition in NaOH.

Symbol szkła Glass	Rodzaj tlenku i jego udział w % wagowych Kind of oxide and its weight percentage									Temp. topn. Melting point [°C]
	SiO ₂	P ₂ O ₅	Al ₂ O ₃	BaO	SrO	ZnO	La ₂ O ₃	Na ₂ O	F	
K-4M	22,11	5,22	18,76	25,39	17,17	-	-	2,28	9,07	1470
III-Zn	26,69	1,51	16,31	-	12,48	20,55	-	4,69	18,77	1140

TABELA 1. Skład chemiczny wypełniaczy.
TABLE 1. Chemical composition of the fillers.

40nm. Volume percentage of the nano - silica varied from 0 to 20% volume. The chemical compositions of glass fillers are presented in TABLE 1, while TABLE 2 shows the compositions of fabricated ceramic polymer composites. The specimens were kept in 0,1M NaOH for 6h, 24h, 144h. Subsequently, flexural strength and microhardness were measured. The measured mechanical properties were compared with the initial state. As a measure of degradation, the percentage decrease in mechanical properties was determined, calculated from the following dependency:

$$s = (w_p - w_k) * 100 / w_p \quad [\%],$$

where:

s - decrease in properties

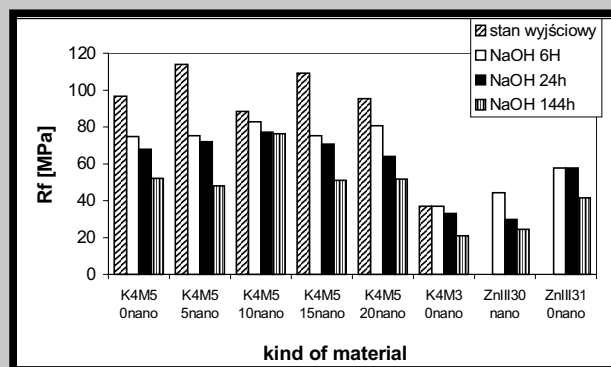
w_p - initial value

w_k - value after 144h in 0,1M NaOH

Results

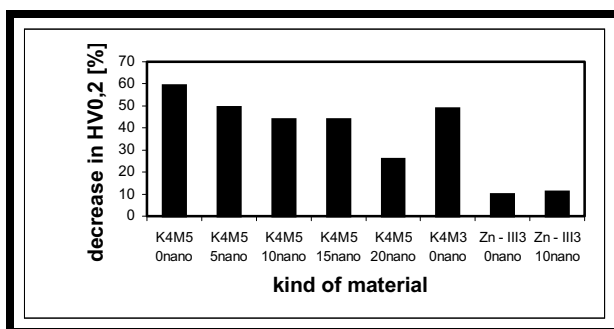
The values of microhardness HV0,2 and flexural strength, measured after various times of exposition in 0,1M NaOH solution for the particular composites, are presented, respectively, in FIGURE 1 and 2. The highest decrease in microhardness HV0,2 was observed for materials with 60% of the K4M filler with the average particle size ~5 and ~3 mm (FIG.3). However, it should be noted that the composite with the K4M5 powder was characterized by the highest microhardness in the initial state (HV0,2 = 60). The lowest decrease was observed for materials with the Zn - III filler (FIG.3), however, they showed a low microhardness in the initial state (HV0,2 < 30). The highest microhardness after 144h of exposition in NaOH solution had the material containing 40% of the K4M filler with the average particle size ~5 mm and 20% of nano - silica.

The composites with the highest flexural strength (K4M5 containing 5 and 15% of nanofiller) (FIG.2) showed, at the



RYS. 2. Wytrzymałość na zginanie HV0,2 badanych materiałów w stanie wyjściowym i po różnych czasach ekspozycji w NaOH.

FIG. 2. Flexural strength HV0,2 of the examined materials in the initial state and after different times of exposition in NaOH.



RYS. 3. Spadek mikrotwardości HV0,2 dla różnych materiałów kompozytowych.
FIG. 3. A decrease in microhardness HV0,2 for various composite materials.

dek odnotowano dla materiałów z wypełniaczem Zn - III (RYS.3), jednak wykazywały one niską mikrotwardość w stanie wyjściowym ($HV_{0,2} < 30$). Najwyższą mikrotwardość po 144h przetrzymywania w roztworze NaOH posiadał materiał zawierający 40% wypełniacza K4M o średniej wielkości cząstek $\sim 5 \mu m$ oraz 20% nanokrzemionki. Kompozyty, mające najwyższą wytrzymałość na zginanie (K4M5 zawierające 5 oraz 15% nanowypełniacza) (RYS.2), wykazywały jednocześnie największy spadek tej właściwości (RYS.4).

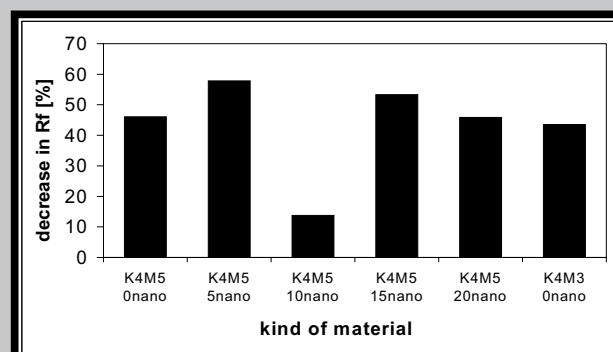
Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż najlepsze właściwości wykazuje kompozyt zawierający 50% wypełniacza K4M o średniej wielkości cząstek $\sim 5 \mu m$ oraz 10 % nanokrzemionki. Oprócz odpowiednio wysokich wartości mikrotwardości $HV_{0,2}$ i wytrzymałości na zginanie, charakteryzuje się relatywnie niskim spadkiem $HV_{0,2}$ oraz najniższym spadkiem wytrzymałości na zginanie. Zaobserwowano zależność pomiędzy zawartością nanokrzemionki a stopniem degradacji kompozytu. Dodatek ceramicznej fazy o średniej wielkości cząstek 40 nm powoduje zmniejszenie szybkości degradacji mierzonej spadkiem wartości $HV_{0,2}$.

Nie stwierdzono związku pomiędzy średnią wielkością cząstek proszków a stopniem degradacji. Parametr ten ma jedynie wpływ na właściwości mechaniczne kompozytów. Wzrost średniej średnicy cząstek powoduje zwiększenie mikrotwardości i wytrzymałości na zginanie.

Podziękowania

Praca sfinansowana ze środków KBN (grant nr 21/ PBZ - KBN - 082/ T08/ 2002).



RYS. 4. Spadek wytrzymałości na zginanie dla różnych materiałów kompozytowych.
FIG. 4. A decrease in flexural strength for various composite materials.

same time, the highest decrease in this property (FIG.4).

Conclusions

On the basis of the performed examinations, it was determined that the best properties shows the composite containing 50% of the K4M filler with the average particle size $\sim 5 \mu m$ and 10 % of nano - silica. Except for the adequately high microhardness $HV_{0,2}$ values and flexural strength, it is also characterized by a relatively low decrease in $HV_{0,2}$ and the lowest decrease in flexural strength.

A dependency between the content of nano - silica and the degradation degree of the composite was observed. Addition of a ceramic phase with the average particle size 40nm brings about a decrease in the degradation rate, measured by a decrease in the $HV_{0,2}$ value.

No correlation was determined between the average particle size of the glass filler and the degradation degree. This parameter affects only the mechanical properties of the composites. An increase of the average particle diameter brings about an increase in microhardness and flexural strength.

Acknowledgements

This work was financed by the Minister of Sciences and Information Society Technologies (grant nr 21/ PBZ - KBN - 082/ T08/ 2002).

Piśmiennictwo

References

- [1] K- J . Soderholm, J. Dent. Res. 60 (1981) 1867
- [2] N. K. Sarkar, A. Karmaker, A. Prasad, F. Shih; Journal of Materials Science Letters 18 (1999) 1749 - 1752

MIEJSCOWA REAKCJA TKANKI KOSTNEJ PO IMPLANTACJI MATERIAŁÓW GIPSOWYCH

B.ŻYWIKA*, J.KARAS***, L.SOLSKI*, S.PIELKA*,
S.MICHAŁOWSK***, J.GARCAREK**, Z.JAEGERMANN***,
K.PORMAŃCZUK****

*ZAKŁAD CHIRURGII EKSPERYMENTALNEJ I BADANIA BIOMATERIAŁÓW AM WE WROCŁAWIU

IPLANT@CHEKSP.AM.WROC.PL

**ZAKŁAD RADIOLOGII AKADEMICKIEGO SZPITALA KLINICZNEGO AM WE WROCŁAWIU

***INSTYTUT SZKŁA I CERAMIKI W WARSZAWIE

****SZPITAL KOLEJOWY WE WROCŁAWIU

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),187-190]

Wprowadzenie i cel pracy

W chirurgii kostnej ciągle istnieje zapotrzebowanie na resorbowalne tworzywa do wypełniania ubytków kości, które zapewniłyby odpowiednią wytrzymałość mechaniczną i prowadziły jednocześnie do wytworzenia nowej tkanki kostnej. Efekt ten uzyskuje się przez odpowiednią modyfikację składu i wytwarzanie wszczepów kompozytowych. Badania doświadczalne wykazały wiele zalet tworzyw gipsowych, które szybciej ulegały resorpcji niż cementy fosforanowo-wapniowe, ułatwiając jednocześnie formowanie się kości [1,2]. Przygotowano trzy rodzaje resorbowalnych materiałów opartych na półwodnym gipsie. W celu podniesienia wytrzymałości mechanicznej jedno z tworzyw wzbogacane zostało poli(alkoholem winylu), drugie - aktywatorem wzrostu tkanki kostnej w postaci fosforanu trójwapniowego. Wprowadzane modyfikacje, wnosząc określone korzyści, mogą w różnym stopniu nasilać procesy zapalne. Celem badań była obserwacja reakcji tkanki kostnej w okresie wczesnym tj po 1 i 3 miesiącach od implantacji tworzyw gipsowych, która obejmowała ocenę stopnia integracji wszczepów z tkanką kostną oraz stopnia resorpcji materiałów gipsowych.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej we Wrocławiu, nr opinii 47/04 z dnia 15.02. 2004.

Materiał i metody

Badano dwa rodzaje tworzyw opartych na siarczanie wapnia ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) z modyfikatorem czasu wiązania - kwaśnym siarczanem potasu (KHSO_4). Jedno z badanych tworzyw zawierało 20% dodatek fosforanu trójwapniowego $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3$, drugie 2,5% dodatek poli(alkoholu winylu). Testowane materiały porównywano z materiałem wyjściowym bez dodatków. Do badań użyto próbek w kształcie walców o wymiarach 3mmx7 mm sterylizowanych radiacyjnie dawką 25 kGy. Badania odczynu tkanki kostnej przeprowadzono na 18 królikach, rasy białej, nowozelandzkiej po implantacji wszczepów do krętarzy kości udowej. W czasie operacji łukowatym, pionowym cięciem skóry w okolicy 1/3 górnej części uda odsłaniano krętarze większy i mniejszy i wykonywano ubytki w kości o średnicy 3mm. Wszczyepy deponowano w tkance kostnej tak, aby ich górna podstawa tworzyła równą powierzchnię się z warstwą okostnej. Ranę zszywano warstwowo stosując do mięśni szwy pojedyncze Polysorb 3-0, a do skóry-Monosoft 3-0. W czasie obserwacji pooperacyjnych kontrolowano ogólną kondycję zwierząt

THE LOCAL REACTION OF BONE TISSUE AFTER IMPLANTATION OF GYPSUM MATERIALS 187

B.ŻYWIKA*, J.KARAS***, L.SOLSKI*, S.PIELKA*,
S.MICHAŁOWSK***, J.GARCAREK**, Z.JAEGERMANN***,
K.PORMAŃCZUK****

*DEPARTMENT OF EXPERIMENTAL SURGERY AND BIOMATERIALS RESEARCH, MEDICAL UNIVERSITY OF WROCŁAW

IPLANT@CHEKSP.AM.WROC.PL

**DEPARTMENT OF RADIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY HOSPITAL, WROCŁAW;

***THE INSTITUTE OF GLASS AND CERAMICS, WARSZAWA;

****RAILWAY HOSPITAL, WROCŁAW.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),187-190]

Introduction and aim of the work

In bone surgery still exists the demand for resorbable materials to fill the decreases of the bone which would assure suitable mechanical endurance and led to producing new osseous tissue simultaneously. Such effect has been achieved by suitable modification of composition and production composite implants. The experimental investigations showed many advantages of gypsum materials which more quickly underwent resorption than the phosphate-calcium cements, simultaneously facilitating the new bone grow [1,2]. The resorbable materials were prepared on the basis of gypsum. One of those materials was enhanced by poli(alcohol-vinyl), with the aim to increase of its mechanical resistance. The second materials was enriched with the activator of growth of bone tissue, i.e. tri-calcium phosphate. It should be stated that those modifications bringing in the definite advantages can in different degree intensify inflammable processes as well.

The main target of this work was the observation of reaction of bone tissue during short term periods i.e. 1 and 3 months after implantation of gypsum materials, including the level of ingrowth into the bone and resorption of the implants.

The work has received the positive opinion of the 1st Local Ethical Board for Animal Experimentation under the number of 47/04 dated 15.02. 2004.

Materials and methods

The basic material was calcium sulphate ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) with modifier of binding time being the acid potassium sulphate (KHSO_4). The first of studied materials contained 20% addition of tri-calcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3$, while the second 2,5% addition of poly(alcohol-vinyl). Tested materials were compared with the pure calcium phosphate material, without any additions. The samples to investigations were used in shape of cylinders 7mm high and 3mm in diameter, sterilized by radiation at 25 kGy. The local bone tissue reaction was underwent on 18 rabbits, of albino New Zealand breed. The tested samples were deposited into trochanters of femur bones. The skin was cut vertically at each upper femoral area, and the upper part of the femur bone was exposed. After cutting and dissecting of the periosteum in each femur two wholes were made of the 3mm diameter in which the implant samples were deposited. The wounds were closed in two layers, muscles with the sutures Polysorb 3/0 and skin with the sutures Monosoft 3/0.

i ruchomość w stawach biodrowych. Sekcje królików wykonano 1 i 3 miesiące po operacji. Oceniano stopień wygojenia się ran, tkanki otaczające implanty, zmiany patomorfologiczne w jamie otrzewnowej, wygląd węzłów chłonnych, nerek, płuc, serca. Podczas sekcji wykonano radiogramy kości kończyn dolnych. Do badań histologicznych pobrano wycinki kości wraz z wszczepami. W badaniach mikroskopowych odwapnioną tkankę kostną barwiono hematoksyliną i eozyną (HE) oraz metodą van Gieson

Wyniki

Badania makroskopowe

Wszystkie operowane zwierzęta przeżyły do planowanych terminów sekcyjnych zachowując prawidłową kondycję, w tym bierną i czynną ruchomość w stawach biodrowych. Rany skórne operowanych zwierząt zagojone były przez rychłozrost.

W 1 miesiącu po implantacji badanych tworzyw gipsowych stwierdzono prawidłową wielkość, kształt i rysunek kości wokół wszczepów. W pojedynczych przypadkach w tkance kostnej otaczającej wszczep obserwowano drobne krwawe wybroczyny. Powierzchnię implantów częściowo pokrywała okostna. W 3 miesiącu po implantacji wszczepy pokryte okostną były słabo widoczne, a ich lokalizacja była trudna także przy pomocy zdjęć radiologicznych.

Badania mikroskopowe

W 1 miesiącu po implantacji wszystkich badanych tworzyw operacyjnie wykonany ubytek kości wypełniała nowo-wytworzona włóknista tkanka łączna, z dużą ilością istoty międzykomórkowej z oraz licznymi fragmentami wszczepionych materiałów. Obraz histologiczny po wszczepieniu gipsu z fosforanem wapnia był podobny jak w grupie kontrolnej. W bezpośrednim sąsiedztwie tworzyw widoczne były pluripotencjalne komórki osteogenne oraz neutrofile i makrofagi. Od strony tkanki kostnej obecne były dość liczne osteoklasty uczestniczące w lizie kości, osteoblasty ułożone wzdłuż beleczek kostnych oraz naczynia krwionośne. Wokół implantów gips- poli(alkohol winylu) liczniej występowały komórki zapalne oraz aktywne osteoklasty.

W 3 miesiącu po implantacji tworzywa kontrolnego oraz gipsu z fosforanem wapnia operacyjny ubytek wypełniony był blaszkowatą tkanką kostną, która sporadycznie w bezpośrednim sąsiedztwie fragmentów tworzywa kontrolnego miała włóknistą strukturę. W miejscu wszczepienia gipsu z fosforanem wapnia widoczna była kość zbita lub gąbczasta w której obecne pozostałości materiału otoczone były blaszkowatą tkanką kostną lub zrębem szpiku kostnego. Materiał ściśle przylegał do tkanki kostnej i często wystawał poza linię naturalnego obwodu beleczki kostnej. W miejscu wszczepienia gipsu z poli(alkoholem winylu) widoczna była włóknista tkanka łączna otaczająca pozostałości wszczepu lub blaszkowata tkanka kostna. W bezpośrednim sąsiedztwie tworzywa obecne były liczne wielojądrowe komórki olbrzymie (RYS.1.a,b,c).

Badania radiologiczne

W radiogramach kości udowych w 1 miesiącu obserwacji widoczne były cylindryczne próbki testowanych tworzyw. Od strony okostnej wejścia do kanałów wszczepowych pozostawały niezasklepione. Implanty grupy kontrolnej i gipsu z fosforanem wapnia miały gęstość identyczną z otaczającą je kością. Szczeliny między operacyjnie wykonanymi ubytkami kości, a wszczepami były wypełnione kostniną. Implanty gips- poli(alkohol winylu) były nieco silniej wysyczone od otaczającej je kości z drobnymi punktami demineralizacji i częściowym rozkawałkowaniem. Szczeli-

During the post-surgery period the general fitness and activity of the animals were observed, with the special attention paid to the proper healing of the surgery wounds. Animals were sacrificed after 1 and 3 months since surgery. At postmortem the level of wound healings were noted as well as any changes in surrounding tissues and the main body organs (eg. liver, kidneys). All legs were skinned and the femoral bone with muscles underwent X-ray examination to show the localization of the implants within the bone. For histological assessment the samples of the bone containing the implants were cut off. The samples after dehydration and decalcification were dyed by two methods: hematoxylin and eosin (HE) and van Gieson.

Results

Macroscopic investigations

All animals which underwent the surgery survived until the given sacrifice time. Their general condition was good, with the proper mobility of both hind legs. All skin wounds were properly healed by first intention.

All bones evaluated after 1 month showed the proper size and external appearance. In several instances some blood ecchymosis were visible in the bone surrounding the implants. The distal ends of the samples were covered by proper periosteum. After 3 months all implants were hardly visible even at X-ray.

Microscopic investigations

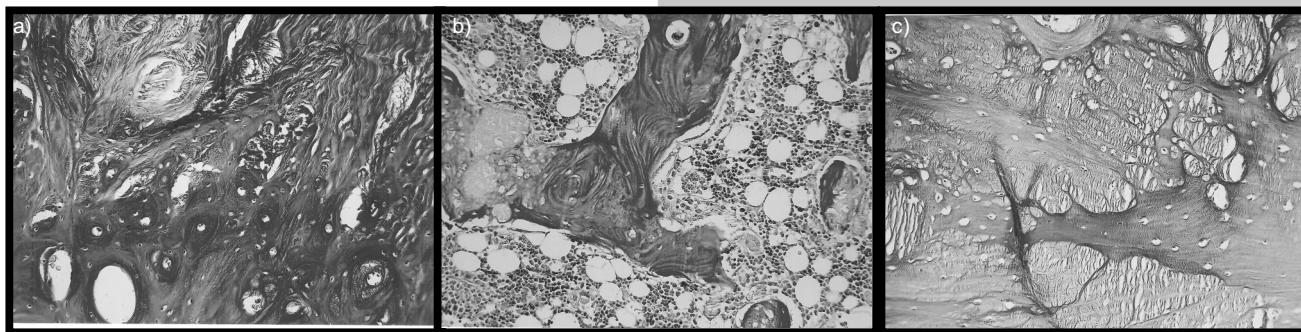
After 1 month since implantation all bone defects were filled in by new, young fibrous connective tissue with the large amount of extracellular matrix, which itself contained the small size debris of implanted materials. Histological the reaction after gypsum and calcium phosphate was comparable to that of control group. By side to those implants leftovers the pluripotential osteogenic cells, macrophages and neutrophils were present. From the site of the bone tissue were present numerous osteoclasts which took part in the lysis process, along with the visible, ingrowth of new vessels. Around the implant of gypsum containing poly(alkohol-vinyl) more inflammatory cells were present along with very active osteoclasts.

In histological findings after 3 months since implantation we discovered that the sites of gypsum samples with calcium phosphate were all filled by laminar new bone tissue, which only in few instances showed the character of fibrous structure. The structure of the new bone was predominantly compact, but in few cases spongy as well with the debris of implanted materials still present. The sites where the implants of gypsum containing poly(alkohol-vinyl) were deposited the fibrous connective tissue was present which surrounded the leftovers of the implanted material, with the presence of numerous multinuclear giant cells (FIG.1.a,b i c).

X-ray assessment

At all X-rays of the femur bones after 1 month since implantation the cylindrical samples of tested materials were clearly visible. From side of periosteum of entry to channels stayed not covered. The implants of control group and group of gypsum with calcium phosphate had the identical thickness and density as the surrounded bone. The cracks were filled in by the newly grown bone. The implants containing poly(vinyl) were a little bit more visible with small dots of demineralization and partially defragmentated.

After 3 month there were no any X-ray with visible tested implants. Only in few instances some small leftovers could have been traced. The bone defects were filled by bone callus of sclerotic edges. All wholes were covered by thin



ny między operacyjnymi ubytkami kości a wszczepem były częściowo wypełnione kostną. W 3 miesiącu wszystkie testowane tworzywa były niewidoczne, jedynie w pojedynczych przypadkach, stwierdzano drobne ich fragmenty. Operacyjnie wykonane ubytki po implantacji materiału kontrolnego i gipsu z fosforanem wapnia wypełnione były dobrze uwapnioną kostną i posiadały brzegi sklerotyczne. Wejścia do kanałów wszczepowych zamknięte były blaszką kostną. Operacyjnie wykonane ubytki po implantacji gipsu z poli(alkoholem winylu) wypełnione były słabo uwapnioną kostną, na brzegach obecna była gruba otoczka osteosklerotyczna. Wejścia do kanałów wszczepowych pozostawały niezasklepione.

Podsumowanie i dyskusja

Na podstawie przeprowadzonych badań implantacyjnych do tkanki kostnej materiałów gipsowych stwierdzono częściową ich resorpcję w 1 i całkowitą w 3 miesiącu obserwacji. Jedynie w badaniach mikroskopowych znajdowano drobne fragmenty wszystkich trzech rodzajów tworzyw gipsowych w nowo wytworzonej tkance kostnej aż do 3 miesiąca obserwacji. Operacyjnie wykonany ubytek kości w 1 miesiącu po implantacji wszystkich badanych tworzyw gipsowych wypełniała włóknista tkanka łączna. Resorpcji materiałów gipsowych towarzyszył proces zapalny z osteolizą kości z udziałem osteoklastów, obecnością komórek zapalnych oraz wynaczynionych erytrocytów. Procesy te najsilniej manifestowały się po implantacji gipsu z poli(alkoholem winylu), mniej materiału kontrolnego, najbardziej ograniczone były w miejscu wszczepienia gipsu z fosforanem wapnia. Prowadziło to do wytworzenia w okresie późniejszym tkanki kostnej o zróżnicowanej budowie i różnym stopniu zmineralizowania. Operacyjny ubytek kości uzupełniony wszczepami gipsu z poli(alkoholem winylu) w 3 miesiącu po wszczepieniu był słabo wypełniony kostną z silnym odczynem osteosklerotycznym. W bezpośrednim sąsiedztwie fragmentów materiału obecne były liczne wielojądrowe komórki ołbrzymie. Wszczepy zarówno gipsu z fosforanem wapnia jak i grupy kontrolnej wykazywały wysoką osteointegrację a operacyjnie wykonane ubytki wypełnione były całkowicie dobrze zmineralizowaną kostną. W pojedynczych przypadkach wokół wszczepów gipsu z fosforanem wapnia obecny był odczyn osteosklerotyczny. Uzyskane dane potwierdzają wyniki badań innych autorów, w których wykazano całkowitą resorpcję tworzyw gipsowych i wytworzenie się blaszkowatej tkanki kostnej w 3 miesiącu po wszczepieniu [2]. W związku z szybkim czasem resorpcji tworzywa gipsowe w okresie wczesnym mogą wywoływać dość nasilone procesy zapalne [3]. Dobre własności osteoindukcyjne materiałów gipsowych może wyjaśniać m.in. ich zdolność do indukcji angiogenezy [4]. Nieliczne doniesienia o wywoływanych reakcjach uczuleniowych związane były z zastosowanymi dodatkami [3].

RYS. 1. Obraz mikroskopowy 3 miesiące po implantacji do kości udowej materiałów gipsowych: a) z dodatkiem poli(alkoholem winylu), b) z dodatkiem fosforanu wapnia, c) tworzywo kontrolne (van Gieson, 230x).

FIG. 1. Microscopic view - 3 months after implantation of the gypsum material into the femur bone: a) containing poly(alcohol-vinyl), b) with additive of calcium phosphate and c) basic, control material (van Gieson, 230x).

bone lamina. In case of implants with poly(vinyl) the defects were filled in by new bone callus but of decreased calcification level with the easy visible osteosclerotic edges.

Discussion

On the basis of the results of conducted investigations of implantation of gypsum materials into bone tissue the partial resorption after 1 month and total resorption after 3 months were noted. Only in microscopic assessment the small debris of all three kinds of tested materials were found in the new grown bone tissue up until 3rd month. The whole made in the bone were filled in by fibrous connective tissue in the case of all tested materials after 1 month time. The resorption reaction was accompanied by the presence of inflammatory cells, osteoclasts and red blood cells. This reaction was of higher degree in case of implants containing poly(vinyl) and of moderate degree in case of gypsum material with calcium phosphate. Such kind of reaction in later stage lead to the formation of new bone of differentiated structure and with different levels of mineralisation. The defects of the bone filled by material containing poly(vinyl) were moderately filled with new bone with the significant osteosclerotic reaction. The multinuclear giant cells were visible by side to the debris of tested material. The sites of implants of gypsum with calcium phosphate and control gypsum material were all filled in with well mineralized new bone tissue, which could be regarded as highly osteointegrated. Only in couple of instances the osteosclerotic reaction was present.

The results we received in this investigation are the confirmation of those received by other authors, who showed the total resorption of gypsum materials in the bones with the new bone tissue present by 3rd month after implantation.[2] But the fast process of resorption of gypsum materials is connected with the high degree of inflammatory reaction at the early stages. [3] Such good osteoinduction of those materials is also connected with their ability to induced the angiogenesis (new vascular growth). [4] Some reported cases of allergic reactions could have been connected with added materials, not with gypsum itself.[3]

Conclusions

1. The gypsum materials resorption was yet significant starting from 1 month after implantation, but small leftovers of

1. Materiały gipsowe ulegały resorpcji w czasie do 1 miesiąca po implantacji, ale drobne ich fragmenty obecne były w tkance kostnej w 3 miesiącu po wszczepieniu.
2. Resorpcji tworzyw gipsowych 1 miesiąc po implantacji towarzyszył nieswoisty proces zapalny i osteolityczny, mocno nasilony po implantacji gipsu z poli(alkoholem winylu), słabiej po wszczepieniu kontrolnego tworzywa gipsowego i najmniej nasilony w miejscu wszczepienia gipsu z fosforanem wapnia.
3. W 3 miesiącu po implantacji wysoką osteointegrację wykazywały wszczepy gipsu z fosforanem wapnia oraz tworzywa kontrolnego, słabszą implanty gipsu z poli(alkoholem winylu).

Podziękowania

Badania wykonane zostały w ramach realizacji projektu celowego Nr 6 T08 0122 2002 C/05848 finansowanego przez Ministra Nauki i Informatyzacji.

Część badań wykonana w ramach projektu badawczego nr 1064 w ramach badań własnych Akademii Medycznej we Wrocławiu.

Piśmiennictwo

- [1] Barrack RL: Bone graft extenders, substitutes, and osteogenic proteins. *J Arthroplasty*. 2005 Jun;20(4 Suppl 2):94-7.
- [2] Guarnieri R, Pecora G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, Orsini G, Piattelli A: Medical grade calcium sulfate hemihydrate in healing of human extraction sockets: clinical and histological observations at 3 months. *J Periodontol*. 2004 Jun;75(6):902-8.

those materials were still present after 3 months.

2. The resorption of gypsum materials was accompanied by nonspecific osteolytic and inflammatory process which increased after implantation of gypsum containing poly(alcohol-vinyl), less visible after implantation of control gypsum material and of small degree after implantation of gypsum with calcium phosphate.

3. After 3 months since implantation the high osteocompatibility was shown by gypsum implants with calcium phosphate and control materials, being of smaller degree in the instance of implants containing poly(alcohol- vinyl).

Acknowledgments

The presented investigations were made possible by granted demanded project of Minister of Science and Information Society Technologies Nr 6 T08 0122 2002 C/05848.

The Part of the investigation was supported by the project number 1064 of the Wrocław Medical University.

References

- [3] Robinson D, Alk D, Sandbank J, Farber R, Halperin N.: Inflammatory reactions associated with and calcium sulfate bone substitute, *Ann Transplant*. 1999;4(3-4):91-7.
- [4] Strocchi R, Orsini G, Iezzi G, Scarano A, Rubini C, Pecora G, Piattelli A.: Bone regeneration with calcium sulfate: evidence handicap increased angiogenesis in rabbits, *J Oral Implantol*. 2002;28(6):273-8.

TECHNIKA OSADZANIA KOMÓREK - KLUCZOWY CZYNNIK W TRÓJWYMIAROWEJ HODOWLI KOMÓREK IN VITRO

PIOTR WOŹNIAK, ANNA CHRÓŚCICKA, RADOSŁAW OLKOWSKI, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL

AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE,
ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,
CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA, POLSKA;
PWOZNIAK@AMWAW.EDU.PL

[*Inżynieria Biomateriałów*, 47-53,(2005),190-193]

Wstęp

Technika osadzania komórek jest jednym z najważniejszych czynników wpływających na trójwymiarową hodowlę komórek in vitro [1,2].

Zawiesina komórek może być nanoszona na rusztowanie 3-D z zastosowaniem metody statycznej lub dynamicznej. Pomimo tego, że pierwsza jest wciąż najbardziej popularna w laboratoriach inżynierii tkankowej, metody dynamicznego osadzania komórek zdobywają coraz więcej nowych

CELL SEEDING TECHNIQUE - THE KEY FACTOR AFFECTING 3-D CELL CULTURE IN VITRO

PIOTR WOŹNIAK, ANNA CHRÓŚCICKA, RADOSŁAW OLKOWSKI, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEL

MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW,
DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY,
CHAŁUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA, POLAND;
PWOZNIAK@AMWAW.EDU.PL

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),190-193]

Introduction

Cell seeding technique is one of the most important factors affecting 3-D cell culture in vitro [1,2].

Generally, cell suspension might be supplied into the scaffold with the use of static or dynamic seeding technique. Although, the first one is still the most popular in tissue engineering laboratories, the group of supporters of the second technique is growing fast.

Dynamic seeding techniques involve using special facilities called bioreactors. There are different types of bioreactors including: spinner flasks, rotating wall vessels and flow

zwolenników.

Techniki związane z dynamicznym nanoszeniem komórek wymagają użycia specjalnych urządzeń zwanych bioreaktorami. Można wyróżnić różne typy bioreaktorów, między innymi: butelki z mieszadłem magnetycznym, naczynia z obracającymi się ścianami oraz bioreaktory z przepływem płynów [3,4].

Użycie tych nowych systemów hodowlanych pozwala na uzyskanie lepszej dystrybucji komórek wewnątrz trójwymiarowej struktury rusztowania [2,5,6].

W niniejszym doświadczeniu, w celu zbadania wpływu techniki osadzania komórek na zakładanie trójwymiarowej hodowli ludzkich osteoblastów na rusztowaniach korundowych porównano ze sobą metodę statyczną i dynamiczną (butelka z mieszadłem magnetycznym).

Materialy i metody

W przedstawionym eksperymencie wykorzystane zostały rusztowania korundowe o indeksie porowatości 60ppi (porów na cal) i wymiarach 10x10x3mm. Tuż przed nanoszeniem komórek, w celu pozbycia się powietrza z porów, rusztowania poddano działaniu podciśnienia a następnie umieszczono w 24 studzienkowej polistyrenowej płytce hodowlanej (TCPS- ang. Tissue Culture Polystyrene). Następnie, próbki zostały zalane pożywką hodowlaną i pozostawione w niej w celu namoczenia aż do następnego dnia.

Osteoblasty użyte w tym oświadczeniu były komórkami ludzkimi, wyizolowanymi z tkanki kostnej amputowanej w czasie zabiegów operacyjnych.

Przed eksperymentem komórki były hodowane w inkubatorze, w temp. 37°C, przy wilgotności 90%, w atmosferze CO₂ o stężeniu 5%.z zastosowaniem medium hodowlanego na bazie Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), wzbogaconego inaktywowanym płodowym serum bydlęcym (FBS) (10% v/v), l-glutaminą (1%) (Gibco), mieszaniną antybiotyk-substancja grzybobójcza (1%) (Gibco) oraz witaminą C (100 mM) (Sigma). Po osiągnięciu konfluencji, komórki zostały oderwane poprzez trypsynizację (0,05% trypsyna) (Gibco), policzone, a następnie naniesione na rusztowania korundowe.

Zastosowano dwie metody osadzania komórek: 1) statyczną oraz 2) dynamiczną, z użyciem butelki z mieszadłem magnetycznym.

W pierwszej, statycznej, 100µl zawiesiny komórek (9x10⁵ komórek/próbkę) powoli naniesiono na rusztowanie za pomocą mikropipety. Próbkę przeniesiono do inkubatora (37°C) na 1,5godz. Po tym czasie, aby zakryć rusztowanie, do każdej studzienki dodano dodatkowe 1,9ml pożywki. Płytki zostały wtedy ponownie umieszczone w inkubatorze i pozostawione tam na 24godz. Następnie rusztowania przeniesiono do nowej 24 studzienkowej płytki hodowlanej, pokryto świeżą pożywką i hodowano przez następne 6 dni. Tą samą procedurę, z wyjątkiem użycia próbek korundowych, zastosowano dla komórek kontrolnych, którymi były osteoblasty naniesione bezpośrednio na dno studzienek płytki hodowlanej (TCPS).

W drugiej metodzie, dynamicznej, rusztowania umieszczono w specjalnym koszyku wykonanym ze stali nierdzewnej. Został on przymocowany do uszczelki korka 250ml butelki z mieszadłem. Do butelki dodano 250ml pożywki zawierającej 9x10⁵ komórek na próbkę a następnie poddano mieszaniu (50rpm) przez 24 godz. w 37°C. Po tym czasie, rusztowania przeniesiono do 24 studzienkowej płytki polistyrenowej (TCPS) i hodowano przez 6 dni w standardowych warunkach.

Siódmego dnia, żywotność/przeżywalność komórek zbadano za pomocą testu XTT. Test XTT jest standardowo uży-

perfusion bioreactors [3,4]. Using those new systems it is possible to obtain better cell distribution throughout the 3-D structure of the scaffold [2,5,6].

In this study, in order to investigate the role of the seeding technique in establishing a three-dimensional culture of Human Bone Derived Cells (HBDCs) on alumina scaffolds static and spinner flask seeding methods were compared.

Materials and methods

In the presented study alumina scaffolds with a porosity index 60ppi (pore per inch) with dimensions of 5x5x3mm were used. Before seeding, to eliminate air from pores, the scaffolds were vacuumed and placed into 24-well tissue culture polystyrene (TCPS) plates. They were pre-wet in culture medium overnight.

Human Bone Derived Cells used in this experiment were harvested from bone chips which otherwise would be discarded. Prior to the experiment, cells isolated from tissue samples were cultured in an incubator under the standard conditions (temperature 37°C, 90% humidity, 5% CO₂). Medium, based on Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), supplemented with heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) (10%v/v) (Gibco), l-glutamine (1%) (Gibco), antibiotic-antimycotic mixture (1%) (Gibco) and L-ascorbic acid 2-phosphate (100 mM) (Sigma) was used. After reaching a confluence, HBDCs were detached by trypsinisation (0.05% trypsin) (Gibco), counted and seeded on the alumina scaffolds.

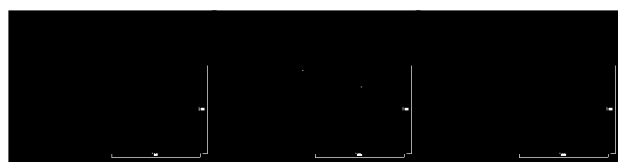
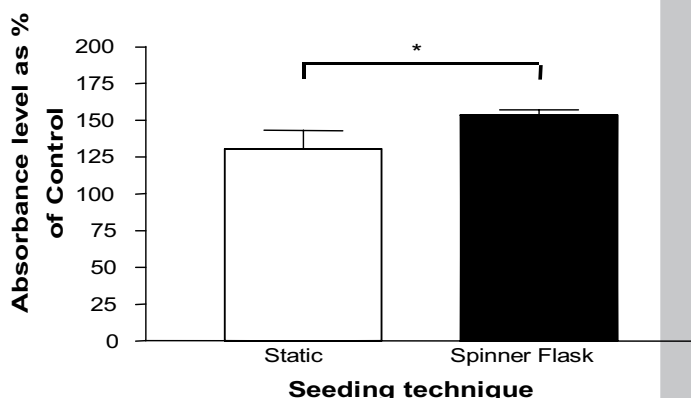
We used two seeding methods: 1) Static and 2) Spinner flask technique.

In the static procedure, 100µl of cell suspension (9x10⁵ cells/scaffold) was slowly dispersed over the top surface of the scaffold with a micropipette. The seeded scaffolds were transferred to a 37°C incubator for 1.5hours, and subsequently an additional 1.9ml of medium was slowly added along the side of the well to cover the scaffold. Then plates were placed back into the incubator and the constructs were cultured statically for 24 hours. Next, the scaffolds were transferred to a new 24-well culture plate, covered with fresh medium and incubated for an additional 6 days. The same procedure, except using alumina scaffolds was used for control cells, which were seeded just on the bottom of the TCPS plate wells.

In the spinner flask method, scaffolds were placed into a special stainless steel basket which was affixed into the silicone stopper at the top of the 250ml spinner flask. 250ml of the medium containing 9x10⁵ cells per scaffold were added to the flask and stirred at 50rpm for 24 hours at 37°C. Then, the scaffolds were removed from the flask, placed into a 24-well culture plate, and incubated in standard conditions for 6 days.

On the seventh day, HBDC viability was examined with XTT assay. This test is used in toxicology and is based on the capacity of mitochondrial dehydrogenase enzymes present in living cells for converting the XTT substrate (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carboxyl]-2Htetrazolium hydroxide) into a water-soluble formazan product. The final product of the reaction is measured by the ELISA reader at 450nm. The results for static and dynamic conditions were compared to the cells cultured on TCPS and expressed as percent of the control.

To evaluate cell distribution within the 3-D structure of the scaffolds, HBDCs were stained with Hoechst dye specific to DNA. Cells were visualised using a fluorescence microscope (Nikon ECLIPSE TE 2000-U).



RYS. 2. Seria zdjęć wykonanych z użyciem techniki fluorescencyjnej. Osteoblasty osadzone metodą statyczną uwidocznione wewnątrz rusztowań korundowych. Wszystkie zdjęcia wykonano w tym samym miejscu, przy tym samym powiększeniu, ale przy różnych ustawieniach ostrości. Jednostka 1 mm.

FIG. 2. The set of pictures using the fluorescence technique. HBDCs are visualised within statically seeded alumina scaffolds. All photos were taken in the same place, in the same magnification, but with different focus settings. Bar 1 mm.

wany w toksykologii. Opiera się on na przemianie soli tetrazolowych (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenyloamino) carboxyl]-2Htetrazolium hydroxide) w rozpuszczalne w wodzie formazany przez dehydrogenazę bursztynianową w mitochondriach żywych komórek. Ilość końcowego produktu powstającego w tej reakcji jest mierzona spektrofotometrycznie w czytniku ELISA przy długości fali 450nm. Wyniki dla obu metod osadzania komórek porównano z komórkami hodowanymi na TCPS i wyrażono jako procent kontroli.

W celu oceny rozmieszczenia komórek wewnątrz trójwymiarowej struktury rusztowania, osteoblasty zostały zabarwione barwnikiem Hoechst, który jest specyficzny do DNA. Komórki zostały uwidocznione z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego (Nikon ECLIPSE TE 2000-U).

Wyniki

Wyniki testu XTT przedstawiono na RYS.1. Poziom absorbancji dla dynamicznej techniki osadzania komórek był statystycznie wyższy niż w przypadku metody statycznej. Ponadto, wyniki dla obu metod były wyższe niż w kontroli (komórkach hodowanych na TCPS).

Podczas obserwacji mikroskopowych, komórki zostały uwidocznione wewnątrz porów rusztowań korundowych (RYS.2, RYS.3). Wykonując serie zdjęć przy różnych ustawieniach ostrości umożliwiło dokładne obejrzenie porów rusztowania. Więcej, lepiej rozmieszczonych osteoblastów zaobserwowano w porach próbek, na których komórki osadzono z użyciem butelki z mieszadłem.

Dyskusja

Wpływ metody osadzania komórek na żywotność ludzki

RYS.1. Wyniki testu XTT dla statycznej i dynamicznej metody osadzania komórek. Dane są przedstawione jako procent kontroli (średnia \pm SD). Gwiazdka oznacza istotną statystycznie różnicę pomiędzy badanymi grupami przy $P < 0.05$ (niezparowany t test z korekcją Welch'a).

FIG.1. The results of XTT assay for static and dynamic seeding technique. The data is presented in percent of positive control as mean \pm SD. Asterisk shows a significant difference between the values for the experimental groups at $*P < 0.05$ by unpaired t test with Welch's correction.



RYS. 3. Seria zdjęć wykonanych z użyciem techniki fluorescencyjnej. Osteoblasty osadzone metodą dynamiczną uwidocznione wewnątrz rusztowań korundowych. Wszystkie zdjęcia wykonano w tym samym miejscu, przy tym samym powiększeniu, ale przy różnych ustawieniach ostrości. Jednostka 1 mm.

FIG. 3. The set of pictures using the fluorescence technique. HBDCs are visualised within dynamically seeded alumina scaffolds. All photos were taken in the same place, in the same magnification, but with different focus settings. Bar 1 mm.

Results

The results of XTT assay are presented in FIG.1. The absorbance level for dynamic seeding technique was significantly higher than in the case of the static method. Moreover, the results for both techniques were higher than in the control (cells cultured on TCPS).

In microscopy examination of HBDCs, cells were visualised into the pores of alumina scaffolds (FIG.2; FIG.3). Taking sets of images with different focus settings we were able to look inside the pores of the scaffolds. There were more HBDCs and they were better visible in the pores of scaffolds seeded using spinner flask than in the case of samples seeded statically.

Discussion

To evaluate the influence of the seeding technique on the viability of Human Bone Derived Cells, XTT assay was performed. The result of this quantitative study indicates that Human Bone Derived Cells seeded using spinner flask bioreactor were significantly more viable - more metabolically active - than cells seeded statically [2,6].

During microscopy evaluation, we examined the penetration of the scaffold by HBDC. Cells were visualised on the surface of the alumina material as well as inside the pores. As can be judged on the basis of FIG.2 and FIG.3 cells were better distributed after dynamic seeding. This observation corresponds with other studies [2,6].

The above observations confirmed that the cell seeding method might be one of the crucial factors affecting the 3-D cell culture in vitro [4].

osteoblastów oceniono za pomocą testu XTT. Wyniki tego ilościowego testu wskazują, iż osteoblasty ludzkie nanoszone przy użyciu butelki z mieszadłem magnetycznym były statystycznie bardziej żywotne, czyli bardziej aktywne metabolicznie niż komórki osadzone metodą statyczną [2,6]. Podczas badań mikroskopowych zbadano penetrację rusztowania przez ludzkie osteoblasty. Komórki uwidoczniły na powierzchni próbek korundowych jak i wewnątrz porów. Na podstawie RYS.2 oraz RYS.3 można stwierdzić, iż komórki były lepiej rozmieszczone po zastosowaniu osadzania dynamicznego. Obserwacja ta nawiązuje do wyników innych doświadczeń [2,6]. Powyższe obserwacje potwierdzają, iż metoda osadzania komórek może być jednym z kluczowych czynników wpływających na efektywność trójwymiarowej hodowli komórek in vitro [4].

Wnioski

Techniki osadzania komórek użyte w tym doświadczeniu wpływały na żywotność i dystrybucję ludzkich osteoblastów hodowanych na trójwymiarowych rusztowaniach korundowych. Metoda dynamicznego osadzania komórek (butelka z mieszadłem) użyta w tym eksperymencie poprawiała efektywność hodowli ludzkich osteoblastów. Do przyszłych doświadczeń związanych z optymalizacją metod hodowli komórek dla inżynierii tkankowej kości rekomendowane są dynamiczne metody osadzania komórek.

Podziękowania

Niniejsza praca została sfinansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji (grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002) oraz Akademii Medycznej w Warszawie (NZME/W2).

WPŁYW STERYLIZACJI RADIACYJNEJ NA BIOKOMPATYBILNOŚĆ POLIURETANÓW - DOŚWIADCZENIE WSTĘPNE

PIOTR WOŹNIAK*, MONIKA BIL**, ANNA CHRÓŚCICKA*, RADOŚŁAW OŁKOWSKI*, GRAŻYNA PRZYBYTNIK***, JOANNA RYSZKOWSKA**, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ*

*AKADEMIA MEDYCZNA W WARSZAWIE, ZAKŁAD BIOFIZYKI I FIZJOLOGII CZŁOWIEKA,

CHALUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSZAWA, POLSKA;

**POLITECHNIKA WARSZAWSKA, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, WOŁOSKA 141, WARSZAWA, 02-507, POLSKA;

***INSTYTUT CHEMII I TECHNIKI JĄDROWEJ, DORODNA 16, 03-195 WARSZAWA,

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),193-196]

Wstęp

Poliuretany (PURs), podobnie jak inne biomateriały wykorzystywane w medycynie wymagają zastosowania sterylizacji w celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia infekcji. Jedną z najlepszych metod sterylizacji jest technika radia-

Conclusions

Cell seeding techniques used in this study influence the viability and distribution of Human Bone Derived Cells cultured on 3-D alumina scaffolds. Spinner flask seeding method used in this experiment enhance the effectiveness of cell culture. In the further research on optimal cell culture method for bone tissue engineering, dynamic seeding techniques are recommended.

Acknowledgements

This work was supported by the Minister of Science and Information Society Technologies (grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002) and Medical University of Warsaw (NZME/W2).

Piśmiennictwo

References

- [1] D. Wendt, A. Marsano, M. Jakob, M. Heberer, I. Martin, *Biotechnol Bioeng* 84, 205-14 (Oct 20, 2003).
- [2] G. Vunjak-Novakovic et al., *Biotechnol Prog* 14, 193-202 (Mar-Apr, 1998).
- [3] A. J. Salgado, O. P. Coutinho, R. L. Reis, *Macromol Biosci* 4, 743-65 (Aug 9, 2004).
- [4] J. S. Temenoff, A. G. Mikos, *Biomaterials* 21, 431-40 (Mar, 2000).
- [5] I. Martin, D. Wendt, M. Heberer, *Trends Biotechnol* 22, 80-6 (Feb, 2004).
- [6] X. Qi, J. G. Liu, Y. Chang, X. X. Xu, *Chin Med J (Engl)* 117, 576-80 (Apr, 2004).

THE INFLUENCE OF RADIOSTERILISATION ON BIOCOMPATIBILITY OF POLYURETHANES-PRELIMINARY STUDY

PIOTR WOŹNIAK*, MONIKA BIL**, ANNA CHRÓŚCICKA*, RADOŚŁAW OŁKOWSKI*, GRAŻYNA PRZYBYTNIK***, JOANNA RYSZKOWSKA**, MAŁGORZATA LEWANDOWSKA-SZUMIEŁ*

*MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW, DEPARTMENT OF BIOPHYSICS AND HUMAN PHYSIOLOGY, CHALUBIŃSKIEGO 5, 02-004 WARSAW, POLAND;

**WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, WOŁOSKA 141, WARSAW, 02-507, POLAND;

***INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY, DORODNA 16, 03-195 WARSAW

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),193-196]

Introduction

Medical application of biomaterials, including polyurethanes (PURs), required the use of sterilisation to minimize the risk of infection. One of the best methods of sterilisation is irradiation [1]. Ionising radiation process may in-

cyjna [1]. Promieniowanie jonizujące może wpływać na niektóre właściwości poliuretanów, między innymi degradację oraz toksyczność [1-6].

O ile nam wiadomo, ilość informacji na temat wpływu dawki promieniowania jonizującego na biogodność poliuretanów in vitro jest ograniczona [1]. Odnotowano, iż rutynowo stosowana w przygotowaniu implantów dawka wynosząca 25kGy, nie ma wpływu na cytotoksyczność PURs [1].

W niniejszym doświadczeniu, w celu oceny wpływu dawki promieniowania jonizującego na biokompatybilność poliuretanów, zbadano żywotność oraz aktywność osteogenną ludzkich osteoblastów in vitro.

Materiały i metody

Lite, poliuretanowe próbki (PUR4PCL1250) o wymiarach $h=2\text{mm}$ i $r=3\text{mm}$ zsyntetyzowano z użyciem: 4,4'-metylenobis (cyklohexylo izocyjanianu) (HMDI), polikaprolaktono diolu (PCL diolu) $M_n \sim 1250$ oraz glikolu etylenowego (EG). Synteza została poprowadzona z zastosowaniem metody prepolimerowej. Otrzymane poliuretany zostały wysterylizowane w akceleratorze liniowym LAE strumieniem elektronów o energii 10 MeV. Użyto dwóch dawek promieniowania: 25kGy oraz 75kGy, w wyniku czego powstały dwa rodzaje materiałów: PUR4PCL1250 25kGy i PUR4PCL1250 75kGy. Następnie, próbki polimerowe zostały umieszczone w studzienkach polistyrenowej płytki hodowlanej (TCPS). W czasie doświadczenia zbadano nie tylko efekt dawki promieniowania ale także wpływ długości okresu po sterylizacji na biokompatybilność zsyntetyzowanych PURs. W tym celu, eksperymenty rozpoczęto w siódmym (Eks.I) i czterdziestym drugim (Eks.II) dniu po sterylizacji.

Osteoblasty użyte w tym doświadczeniu były komórkami ludzkimi, wyizolowanymi z tkanki kostnej amputowanej w czasie zabiegów operacyjnych.

Przed eksperymentem komórki były hodowane w inkubatorze, w temp. 37°C , przy wilgotności 90%, w atmosferze CO_2 o stężeniu 5%.z zastosowaniem medium hodowlanego na bazie Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), wzbogaconego inaktywowanym płodowym serum bydlęcym (FBS) (10% v/v), l-glutaminą (1%) (Gibco), mieszaniną antybiotyk-substancja grzybobójcza (1%) (Gibco) oraz witaminą C (100 mM) (Sigma). Po osiągnięciu konfluencji, komórki zostały oderwane poprzez trypsynizację (0,05% trypsyna) (Gibco), policzone, a następnie naniesione na próbki poliuretanowe.

Doświadczenie przeprowadzono w 96 studzienkowej polistyrenowej płytce hodowlanej. Zawiesinę osteoblastów ludzkich ($1,5 \times 10^3$ komórek/próbkę) powoli naniesiono na powierzchnię rusztowania. Po 24 godz. inkubacji w 37°C , pożywkę zmieniono na świeżą, wzbogaconą dodatkowo deksametazonem (10nM) (Sigma) oraz witaminą D_3 (10nM) (Sigma). Przez następne sześć dni osteoblasty hodowano w inkubatorze w standardowych warunkach. Tą samą procedurę, z wyjątkiem użycia próbek poliuretanowych, zastosowano dla komórek kontrolnych, którymi były osteoblasty naniesione bezpośrednio na dno studzienek płytki hodowlanej (TCPS).

Siódmego dnia, żywotność/przeżywalność komórek zbadano za pomocą testu XTT. Test XTT jest standardowo używany w toksykologii. Opiera się on na przemianie soli tetrazolowych (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenyloamino) carboxyl]-2Htetrazolium hydroxide) w rozpuszczalne w wodzie formazany przez dehydrogenazę bursztynianową w mitochondriach żywych komórek. Ilość końcowego produktu powstającego w tej reakcji jest mierzona spektrofotometrycznie w czytniku ELISA przy długości fali 450nm. Wyniki dla badanych PURs porównano z komórkami

fluence some properties of polyurethanes, including degradation and toxicity [1-6].

To the best of our knowledge, there is little information about the influence of the dose of irradiation on polyurethanes biocompatibility in vitro [2]. It was found that the dose of γ -irradiation - 25kGy, routinely used in medical implants preparation - does not affect cytotoxicity of PURs [2].

In this study, in order to evaluate the influence of dose of ionising irradiation on biocompatibility of polyurethanes, we examined the viability and osteogenic activity of Human Bone Derived Cells (HBDCs) in vitro.

Materials and methods

Solid polyurethane samples (PUR4PCL1250) with the dimensions $h=2\text{mm}$ $r=3\text{mm}$ were synthesized by using 4,4'-methylenebis (cyclohexyl isocyanate) (HMDI), polycaprolactone diol (PCL diol) $M_n \sim 1250$ and ethylene glycol (EG). The synthesis was performed with the prepolymer method. Subsequently, the obtained polyurethanes were sterilised in linear accelerator LAE by 10 MeV electrons. Two different doses of radiation were used: 25kGy and 75kGy, which led to the creation of two types of materials: PUR4PCL1250 25kGy and PUR4PCL1250 75kGy. After that, polyurethane samples were placed into the wells of tissue culture polystyrene (TCPS) plate.

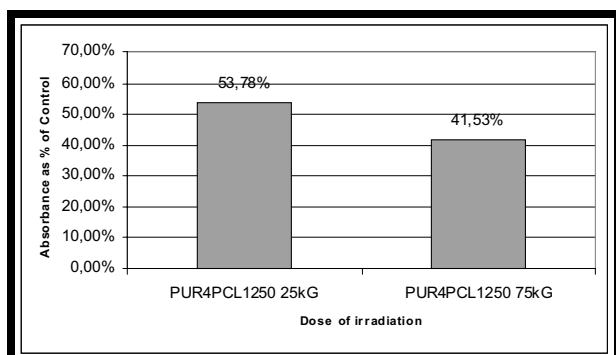
We examined not only the effect of the irradiation dose, but also the influence of the time period after sterilisation on the biocompatibility of synthesized PURs. To achieve this goal, experiments were started on the 7th (Exp.I) and 42nd (Exp.II.) day after sterilisation.

Human Bone Derived Cells used in this experiment were harvested from bone chips which otherwise would be discarded. Prior to the experiment cells isolated from tissue samples were cultured in an incubator under the standard conditions (temperature 37°C , 90% humidity, 5% CO_2). Medium, based on Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), supplemented with heat-inactivated foetal bovine serum (10%v/v) (FBS) (Gibco), l-glutamine (1%) (Gibco), antibiotic-antimycotic mixture (1%) (Gibco) and L-ascorbic acid 2-phosphate (100 mM) (Sigma) was used. After reaching a confluence, HBDCs were detached by trypsinisation (0.05% trypsin) (Gibco), counted, and seeded on the polyurethane samples.

The experiment was performed in a 96-well TCPS plate. HBDC suspension ($1,5 \times 10^3$ cells/scaffold) was slowly dispersed over the top surface of the PURs samples. After 24 hours of incubation at 37°C , the medium was replaced by fresh medium, supplemented with dexamethasone (Sigma) at concentration of 10nM and $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol (vitamin D_3) (Sigma) at concentration of 10nM. For the next six days HBDCs were maintained in culture medium at 37°C in a humidified atmosphere. The same procedure, except using polyurethane scaffolds was used for control cells, which were seeded just on the bottom of the TCPS plate wells.

On the seventh day, HBDC viability was examined with XTT assay. This test is used in toxicology and is based on the capacity of mitochondrial dehydrogenase enzymes present in living cells for converting the XTT substrate (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenyloamino) carboxyl]-2Htetrazolium hydroxide) into a water-soluble formazan product. The final product of the reaction is measured by the ELISA reader at 450nm. The results for examined PURs were compared to the cells cultured on TCPS and expressed as percent of the control.

On the eighth day of the culture, ALP activity was evaluated by means of an ALP SIGMA Diagnostic Kit. The amount of the final product was determined by the absorbance level at 405nm wavelength using the ELISA reader. The results for examined materials were related to the ALP activity in



RYS. 1. Wyniki testu XTT z Eks.I. Dane przedstawiono jako procent kontroli pozytywnej.
FIG. 1. The results of XTT assay from Exp.I. Data is presented in percent of positive control.

mi hodowanymi na TCPS i wyrażono jako procent kontroli. Ósmego dnia hodowli, aktywność fosfatazy alkalicznej (ALP) została zmierzona za pomocą ALP SIGMA Diagnostic Kit. Ilość ostatecznego produktu tej reakcji została określona spektrofotometrycznie w czytniku ELISA przy długości fali 405nm. Wyniki dla badanych materiałów odniesiono do aktywności ALP komórek hodowanych na TCPS i wyrażono jako procent kontroli.

Wyniki

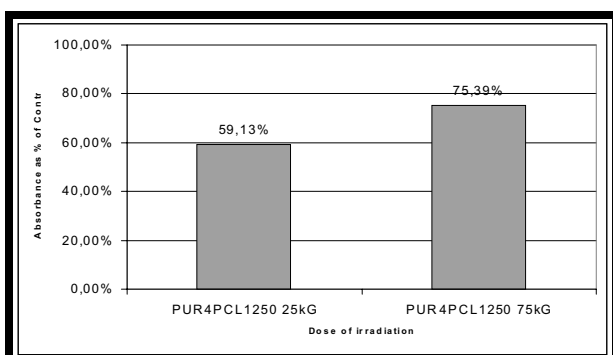
Wyniki testu XTT z eksperymentu I oraz II są przedstawione, odpowiednio, na RYS.1 i RYS.2.

Poziom absorancji dla PURs sterylizowanych przy użyciu wyższej dawki promieniowania był niższy niż w przypadku PURs poddanych działaniu dawki 25kGy. Tendencja ta była zauważalna w doświadczeniach przeprowadzonych w obu punktach czasowych, jednakże wyniki dla próbek zbadanych 7 dni po napromieniowaniu (RYS.1) były wyższe niż w przypadku PURs zbadanych po 42 dniach (RYS.2).

Na RYS.3 i RYS.4, przedstawiono wyniki aktywności ALP z doświadczenia I i II. Wyniki dla poliuretanów sterylizowanych dawką 75kGy były wyższe niż dla materiałów napromieniowanych dawką 25kGy. Podobną zależność odnotowano w obu zbadanych punktach czasowych, jednakże poziom absorancji w Eks.I był niższy niż w Eks.II.

Dyskusja

Jak można ocenić na podstawie testu XTT, żywotność/przeżywalność ludzkich osteoblastów była zależna od dawki promieniowania jonizującego użytego do sterylizacji badanych próbek poliuretanowych.



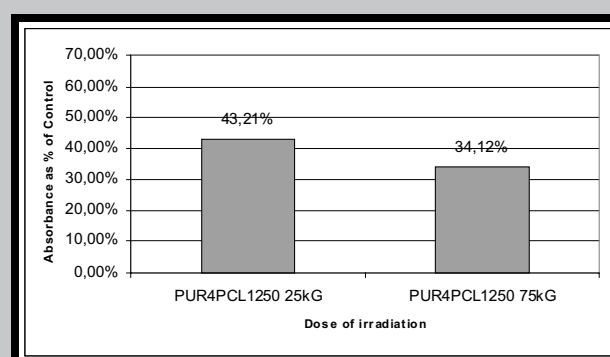
RYS. 3. Wyniki testu ALP z Eks.I. Dane przedstawiono jako procent kontroli pozytywnej.
FIG. 3. The results of ALP activity assay from Exp.I. Data is presented in percent of positive

cells seeded on TCPS, and are expressed as percent of positive control.

195

Results

The results of XTT assays from Exp.I and Exp.II are presented in FIG.1 and FIG.2, respectively. The absorbance level for PURs sterilised with a higher dose of irradiation was lower than in the case of PURs sterilised with 25kGy. This tendency was observed for experiments performed at both time points. However, the results for samples examined 7 days after the irradiation (FIG.1) were higher than in the case of PURs investigated after 42 days (FIG.2). In FIG.3 and FIG.4, the results of ALP activity assay for Exp.I and Exp.II are presented. The results for PURs sterilised with 75kGy dose were higher than in the case of material irradiated with 25kGy. A similar relationship was detected at the two examined time points, though the absorbance level in Exp.I was lower than in the case of Exp.II.

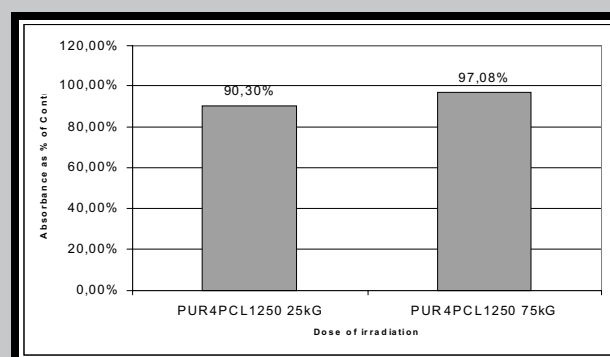


RYS. 2. Wyniki testu XTT z Eks.II. Dane przedstawiono jako procent kontroli pozytywnej.
FIG. 2. The results of XTT assay from Exp.II. Data is presented in percent of positive control.

Discussion

As can be judged on the basis of XTT assay, viability of HBDC was dependent on the dose of ionising radiation used for sterilisation of the examined polyurethane samples. It was found that a higher absorbed dose decreases the viability of cells cultured on the surface of PURs.

There was also a post-sterilisation-time dependence in the reaction of HBDC. If the biocompatibility study was performed in a few weeks after sterilisation, cells were less viable than in the case when the experiment was done in a few days after irradiation.



RYS. 4. Wyniki testu ALP z Eks.II. Dane przedstawiono jako procent kontroli pozytywnej.
FIG. 4. The results of ALP activity assay from Exp.II. Data is presented in percent of positive control.

Odnótowano, iż wyższa dawka pochłonięta promieniowania obniża żywotność komórek hodowanych na powierzchni PURs.

Zaobserwowano również zależność reakcji osteoblastów ludzkich od długości okresu po sterylizacji. Jeżeli badanie biozgodności wykonywano kilka tygodni po sterylizacji komórki były mniej żywotne niż w przypadku gdy doświadczenie przeprowadzano kilka dni po napromieniowaniu.

Aktywność osteogeniczna ludzkich osteoblastów została określona na podstawie pomiarów aktywności ALP. Była ona zależna zarówno od dawki promieniowania, jak i okresu jaki minął od sterylizacji. W przeciwieństwie do żywotności, aktywność osteogeniczna komórek wzrastała wraz ze wzrostem dawki promieniowania, i była najwyższa dla PURs wysterylizowanych dawką 75kGy i zbadanych po 42 dniach od sterylizacji.

Wnioski

Dawka promieniowania elektronowego wykorzystana do sterylizacji próbek poliuretanowych użytych w tym doświadczeniu wpłynęła na żywotność/przeżywalność ludzkich osteoblastów hodowanych na powierzchni tych materiałów.

Próbki poliuretanowe sterylizowane niższą dawką promieniowania jonizującego są lepiej tolerowane przez ludzkie osteoblasty niż próbki sterylizowane z użyciem wyższej dawki.

Osteogeniczna aktywność ludzkich osteoblastów oszacowana na podstawie pomiarów aktywności ALP była wyższa na poliuretanach sterylizowanych wyższą dawką promieniowania.

Reakcja ludzkich osteoblastów hodowanych na powierzchni badanych poliuretanów zależała od czasu jaki upłynął od sterylizacji.

Poliuretany badane siedem dni po sterylizacji były bardziej biokompatybilne niż próbki oceniane po czterdziestu dwóch dniach od napromieniowania. Jednakże, poziom aktywności osteogenicznej ludzkich osteoblastów, oceniany na podstawie aktywności ALP, był wyższy w przypadku poliuretanów badanych 42 dni po sterylizacji.

Powyższe wyniki doświadczeń wstępnych wymagają potwierdzenia i dalszej wnikliwej analizy w celu wyjaśnienia czynników odpowiedzialnych za obserwowane zjawiska.

Podziękowania

Niniejsza praca została sfinansowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji (grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002, i 4 TO8E 01824) oraz Akademii Medycznej w Warszawie (NZME/W2).

Piśmiennictwo

- [1] Lamba NMK, Woodhouse KA, Cooper SL. Polyurethane Processing and Survey of Biomedical Polyurethanes-Sterilization. In: Polyurethanes in Biomedical Applications. Washington, DC: CRS Press; 1998. p. 36-43.
- [2] Sheikh N. The effect of radiosterilization on cytotoxicity of polyurethane film. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 2003;208:215-219.
- [3] Shintani H. Formation and elution of toxic compounds from sterilized medical products: methylenedianiline formation in polyurethane. J Biomater Appl 1995;10(1):23-58.

The osteogenic activity of HBDCs, which was estimated on the basis of ALP activity measurement, depended on both the irradiation-dose as well as the post-sterilisation-time. In contrary to the viability, the osteogenic activity of cells increased with the radiation dose, and was the highest for PURs sterilised with 75kGy and examined 42 days after irradiation with electron beam.

Conclusions

The dose of ionising radiation used for sterilisation of polyurethane samples used in this study influenced the viability and differentiation of Human Bone Derived Cells cultured on the surface of this material.

Polyurethane samples sterilised with a lower dose of irradiation are better tolerated by Human Bone Derived Cells than samples irradiated with a higher dose.

The osteogenic activity of Human Bone Derived Cells estimated on the basis of ALP activity measurement was higher in the case of polyurethanes sterilised with a higher dose of radiation.

There was a post-sterilisation-time dependence in the reaction of Human Bone Derived Cells cultured on the examined polyurethane samples.

Polyurethanes examined seven days after sterilisation were more biocompatible in Human Bone Derived Cells culture than polyurethanes evaluated forty-two days after irradiation. Although the level of osteogenic activity of Human Bone Derived Cells, estimated on the basis of ALP activity measurement, was higher in the case of polyurethanes studied forty-two days after sterilisation.

There is a need of further investigations in order to confirm the reported preliminary study, as well as to explain the factors responsible for the observed phenomena.

Acknowledgements

This work was supported by the Minister of Science and Information Society Technologies (grant 05/PBZ-KBN-082/T08/2002 and 4 TO8E 01824) and by the Medical University of Warsaw (NZME/W2).

References

- [4] Gorna K, Gogolewski S. The effect of gamma radiation on molecular stability and mechanical properties of biodegradable polyurethanes for medical applications. Polymer Degradation and Stability 2003;79(3):465-474.
- [5] Shintani H. The relative safety of gamma-ray, autoclave, and ethylene oxide gas sterilization of thermosetting polyurethane. Biomed Instrum Technol 1995;29(6):513-9.
- [6] Shintani H, Nakamura A. Formation of 4,4'-methylenedianiline in polyurethane potting materials by either gamma-ray or autoclave sterilization. J Biomed Mater Res 1991;25(10):1275-86.

DEGRADACJA KOMPOZYTÓW Z POLIMERÓW RESORBOWALNYCH W WARUNKACH IN VIVO

JAN CHŁOPEK*, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ*,
MAREK ADWENT**, AGATA CIEŚLIK-BIELECKA**,
MAGDALENA CIEŚLIK**

*AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW

**I KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ
ŚL. A.M. W ZABRZU

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),197-202]

Wprowadzenie

W ostatnich latach coraz większe znaczenie w implantologii zyskują materiały kompozytowe na bazie polimerów resorbowalnych [1,2]. Same polimery resorbowalne nabrały znaczenia w medycynie (w szczególności w chirurgii kostnej), ze względu na ich biogodność oraz możliwość stopniowej resorpcji z równoczesnym zastępowaniem implantu tkanką kostną. Aby jednak ta funkcja mogła być właściwie zrealizowana konieczna jest ścisła kontrola czasu resorpcji oraz dostosowanie tego czasu do szybkości tworzenia nowej tkanki [3,4,5]. Zastosowanie polimerów wymaga również poprawy ich właściwości mechanicznych poprzez dodatek fazy wzmacniającej. Materiały kompozytowe, w zależności od rodzaju wzmocnienia, jego udziału objętościowego i rozmieszczenia przestrzennego stwarzają szerokie możliwości sterowania zarówno właściwościami mechanicznymi, jak również pozwalają wpływać na zachowanie biologiczne takiego implantu. Zastosowanie jako modyfikatora bioaktywnej ceramiki pozwala stymulować wzrost tkanki kostnej [6], włókna węglowe mogą stanowić rusztowanie dla rosnącej kości, a włókna z polimerów resorbowalnych umożliwiają stworzenie materiałów o gradientowych właściwościach resorpcyjnych [7]. W ten sposób możliwe jest uzyskanie materiałów wielofunkcyjnych, które w początkowym etapie pełnią funkcję mechaniczną, a następnie ulegając kontrolowanej degradacji pozwalają regenerowanej tkance na stopniowe przejmowanie obciążeń, dodatkowo stymulując jej wzrost. Stosując kompozyt z włóknami węglowymi nie można zapomnieć, że w zależności od parametrów technologicznych procesu otrzymywania włókien mają one bardzo zróżnicowane właściwości. Dla celów medycznych, jako włókna biogodne uważa się włókna otrzymane metodą niskotemperaturową [8]. Celem pracy była analiza wpływu włókien węglowych krótkich na czas resorpcji kopolimeru laktydu z glikolidem (PGLA) w warunkach in vivo.

Materiały i metody

Badania przeprowadzono na próbkach w kształcie wałków wykonanych z kopolimeru L-laktydu z glikolidem (PGLA): 84% laktydu i 16% glikolidu ($M_n=85000$ Da, $M_w/M_n=2,1$), wyprodukowanego w Centrum Chemii Polimerów PAN w Zabrzu. Kompozyt otrzymano przez dodatek 15% wag. włókien węglowych krótkich (CF): FT 300B Torayca ($d=1,76$ g/cm³, $\sigma_r=3,2$ GPa, $E=235$ GPa). Wałce wykonano metodą wtrysku w temperaturze 180°C. Badania doświadczalne in vivo przeprowadzono na grupie

IN VIVO DEGRADATION OF RESORBABLE POLYMER COMPOSITES

197
.....

JAN CHŁOPEK*, ANNA MORAWSKA-CHOCHÓŁ*,
MAREK ADWENT**, AGATA CIEŚLIK-BIELECKA**,
MAGDALENA CIEŚLIK**

*AGH UST UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, KRAKOW
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS

**I DEPARTMENT AND CLINIC OF ORAL AND MAXILLOFACIAL
SURGERY OF SILESIAN MEDICAL ACADEMY, ZABRZE

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),197-202]

Introduction

Composite materials based on resorbable polymers play increasing role in implant research in recent years [1,2]. Resorbable polymers as such gained importance in medicine (in particular in bone surgery), due to their biocompatibility and the ability of gradual resorption, simultaneous with implant replacement by the bone tissue. In order to realize properly this function, strict control of time of resorption is necessary, together with adjustment of this time to formation rate of a new tissue [3,4,5]. Use of polymers requires improvement in their mechanical properties by addition of reinforcing phase. Composite materials, depending on the type of reinforcement used, its volume content and spatial distribution, introduce large possibilities of designing both mechanical properties and biological behaviour of such implant. Application of bioactive ceramic as a modifying agent allows to stimulate the growth of bone tissue [6]. At the same time carbon fibres may constitute the scaffolding for the growing bone, while resorbable polymer fibres enable the formation of materials with gradual resorption properties [7]. This way preparation of multifunctional materials becomes possible, which during the initial stages fulfil the mechanical function, and then they undergo controlled degradation, thus allowing the tissue being regenerated for partial load transfer, additionally stimulating its growth. Using carbon fibre composites, it should not be disregarded that depending on technological parameters of carbon fibres fabrication method, they may acquire very different properties. Carbon fibres obtained by the low temperature process [8] are generally considered as biocompatible in medical applications.

The aim of the present work was the analysis of the effects of short carbon fibres on resorption time of lactide-glycolide co-polymer (PGLA) under in vivo conditions.

Materials and methods

The study was carried out on cylinder-shaped samples made of co-polymer of L-lactide with glycolide (PGLA): 84% lactide and 16% glycolide ($M_n=85000$ Da, $M_w/M_n=2,1$), manufactured at the Centre for Polymer Chemistry PAN in Zabrze, Poland. The composite was made by addition of 15 wt.% short carbon fibres (CF): FT 300B Torayca ($d=1,76$ g/cm³, $\sigma_r=3,2$ GPa, $E=235$ GPa). Cylinders were made by injection at the temperature of 180°C.

The in vivo experiments were carried out on sample group of 30 New Zealand rabbits of different sexes and with weights ranging from 3500 to 4000g. All surgeries were performed at the Central Animal Farm of Silesian School of Medicine, with permission of Bioethics Commission. Implants were

30 królików nowozelandzkich różnej płci i wadze 3500-4000 g. Wszystkie zabiegi prowadzone były w Centralnej Zwierzętni Śląskiej Akademii Medycznej za zgodą Komisji Bioetycznej. Wszczępy wprowadzano w chirurgicznie przygotowane łóżysko o średnicy 3,2 mm na bocznej powierzchni przynasady dalszej kości udowej. Okresy kontrolne wyznaczono na 1,2,3,6,12,24,48 tydzień od implantacji materiału. Obserwację mikroskopową granicy kość-implant wraz z analizą pierwiastków wykonano na mikroskopie scanningowym (SEM) z przystawką EDS, badania składu fazowego metodą spektroskopii w podczerwieni (FTIR), wytrzymałość wiązania kość implant określono metodą push-out na maszynie wytrzymałościowej Zwick 1435.

Wyniki

Określony w poprzedniej pracy czas resorpcji polimeru w warunkach in vitro [9] może ulec zmianie w trakcie przebywania polimeru w środowisku organizmu żywego. Selektowna adsorpcja białek oraz różne warunki wynikające z miejsca implantacji (pH, naprężenia), mogą w dużym stopniu wpływać na te zmiany. W przypadku walców implantowanych do kości udowej królika czas resorpcji polimeru określono wstępnie na podstawie zdjęć mikroskopowych. Na zdjęciu otrzymanym po 2 tygodniach implantacji (RYS.1a) czystego PGLA widoczne są już puste miejsca w implancie pozostawione przez zresorbowany polimer. Powierzchnia implantu jest jednak zwarta i ściśle przylega do tkanki kostnej. Analiza EDS wskazuje na obecność w otaczającej tkance kostnej tlenu i węgla pochodzących z resorpcji polimeru, natomiast w porach implantu obecna jest jedynie tkanka łączna (podwyższona zawartość tlenu i węgla oraz brak wapnia i fosforu). Zdjęcia mikroskopowe wraz z analizą EDS otrzymane dla preparatu po 6 tygodniach implantacji (RYS.1b) pokazują, że proces resorpcji biegnie równocześnie z procesem narastania tkanki kostnej w wy-

introduced into surgically prepared placenta of diameter 3.2mm, on the side surface of metaphysis of distal femoral bone. The control periods were defined as 1,2,3,6,12,24,48 weeks after material implantation.

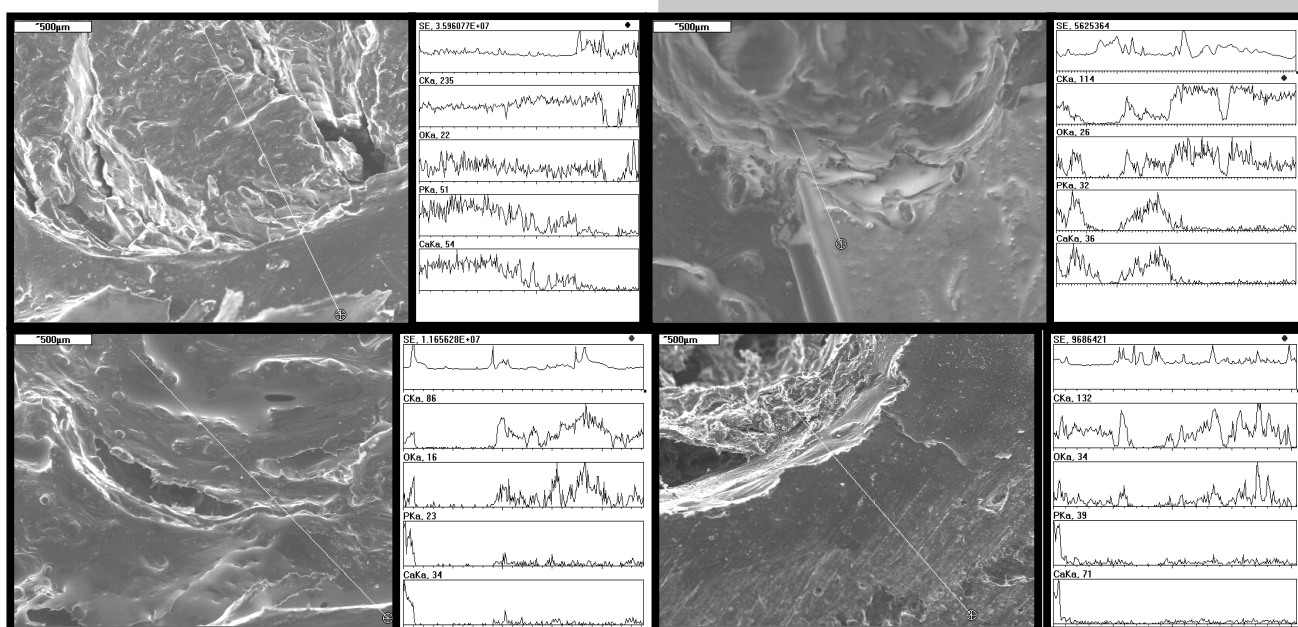
Microscopic observations of bone-implant border, together with elemental analysis, were performed using the scanning electron microscope equipped with EDS unit. Phase composition was determined using the infra-red spectroscopy method (FTIR), and strength of implant/bone bond was defined by "push-out" technique using Zwick 1435 universal testing machine

Results

The polymer resorption time under in vitro conditions was determined in previous work [9], but it may vary during polymer stay in the life body environment. Selective protein adsorption and different conditions specific to the area of implantation (pH, stresses), may affect these variations significantly.

In the case of cylindrical sample implanted into rabbit's thigh bone, the resorption time of polymer was determined in a preliminary way based on microscopic photographs. The picture obtained after two weeks of implantation (FIG.1a) of pure PGLA, shows empty areas in the implant left after resorption of the polymer.

However, the implant's surface is still compact and adheres tightly to the bone tissue. The EDS analysis indicates the presence of oxygen and carbon within the surrounding bone tissue, originating from polymer resorption, while in implant's pores there is only connective tissue present (increased content of oxygen, carbon, and lack of calcium and phosphorus). The photomicrographs together with EDS analysis obtained after 6 weeks implantation (FIG.1b) indicate that resorption process goes in parallel with the process of growing of bone tissue. As the result, the bone overgrows the

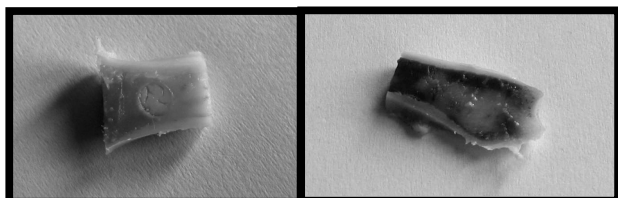


RYS. 1. Mikrofotografie i analiza EDS wzdłuż linii przekrojów implantów PGLA w kości udowej królika: a) po 2, b) po 6, c) po 12, d) po 48 tygodniach implantacji.

FIG. 1. Photomicrographs and EDS analyses along PGLA implant cross-sections within rabbit thigh bone: a) after 2, b) after 6, c) after 12, d) after 48 weeks of implantation.

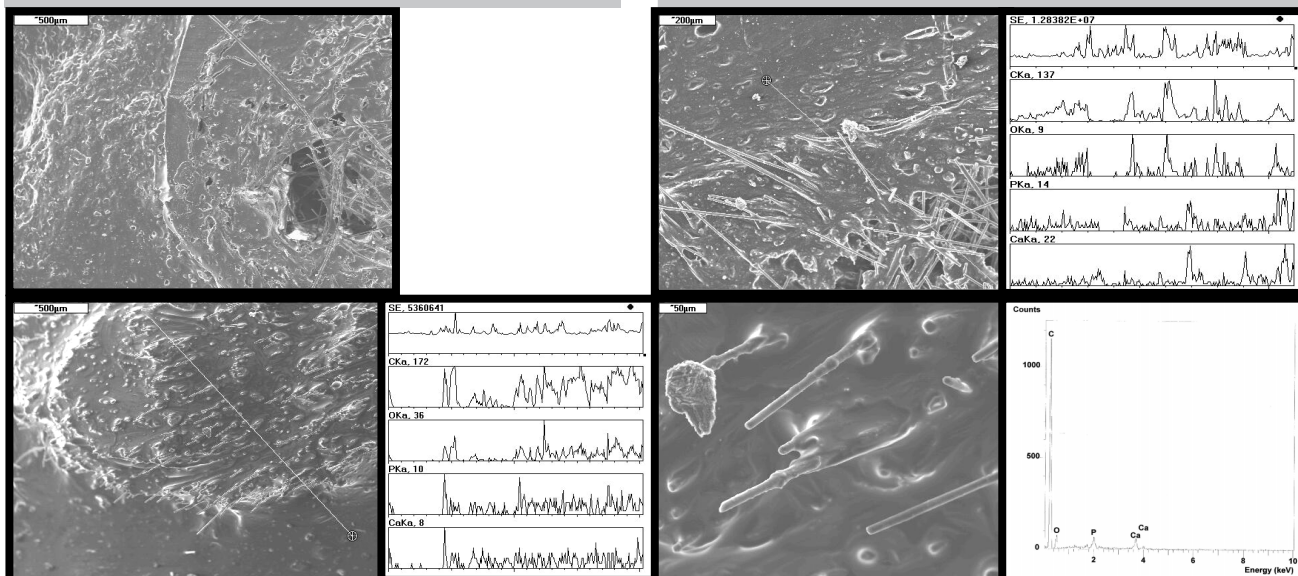
implant and the border between these phases becomes invisible. The EDS analysis of preparations after 12 and 48 weeks (FIG.1c,d) points at traces of calcium and phosphorus ions, while significant contribution of connective tissue is still remarkable. High oxygen and carbon content may also result from the presence of bone marrow around the implant. After 48 weeks of implantation, the polymer area becomes completely replaced by the connective tissue.

The macrographs confirm the above conclusions



RYS. 2. Fotografie implantów PGLA w kości udowej królika: a) po 12, b) 48 tygodniach implantacji.

FIG. 2. The photographs of PGLA implant within rabbit thigh bone: a) after 12, b) after 48 weeks of implantation.



RYS. 3. Mikrofotografie i analiza EDS wzdłuż linii przekrojów implantów PGLA+CF w kości udowej królika: a) po 12, b) po 24, c) po 48 tygodniach implantacji, d) po 48 tygodniach implantacji (przy większym powiększeniu).

FIG. 3. Photomicrographs and EDS analyses along the cross-sections of PGLA+CF implants in rabbit thigh bone: a) after 12, b) after 24, c) after 48 weeks of implantation, d) after 48 weeks of implantation (close-up).

niku czego kość zaczyna przeplatać się z implantem a granica między nimi staje się niezauważalna. Analiza EDS preparatów po 12 i 48 tygodniach implantacji (RYS.1c,d) wskazuje na śladowe ilości jonów wapnia i fosforu, natomiast nadal widoczny jest duży udział tkanki łącznej. Wysoka zawartość tlenu i węgla może być również wynikiem obecności szpiku kostnego wokół implantu. Po 48 tygodniu implantacji miejsce po polimerze zostało całkowicie zastąpione przez tkankę łączną.

Fotografie w skali makro potwierdzają powyższe wnioski (RYS.2a,b). Po 12 tygodniach implantacji spękany implant wciąż wypełnia kanał wszczepu, natomiast po 48 tygodniach w miejscu wszczepu widoczne jest jasna tkanka rozprzestrzeniona w szpiku.

W przypadku implantów kompozytowych z włóknem węglowym proces resorpcji polimeru biegnie intensywnie dopiero między 12 a 24 tygodniem implantacji. Wskazują na to obrazy mikroskopowe, gdzie w przypadku preparatu po 12 tygodniach przebywania w organizmie biologicznym włókna węglowe są jeszcze w dużym stopniu ukryte w polimerowej osnowie, a miejscami widoczne są pory pozosta-

(RYS.2a,b). After 12 weeks of implantation, the cracked implant fills the implantation canal, whereas after 48 weeks, bright tissue developed within the marrow can be seen in place of the implant.

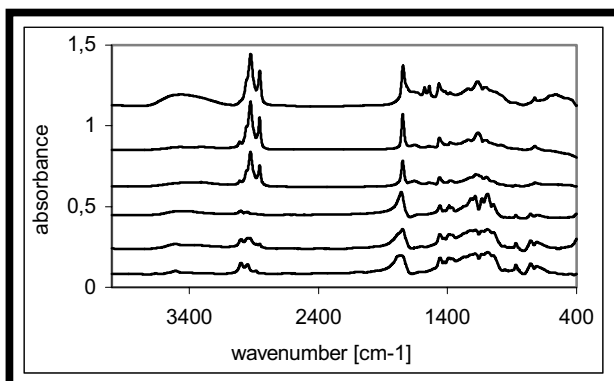
In the case of composite implants containing carbon fibre, the polymer resorption process becomes intensive only between the 12th and 24th week of implantation. This is confirmed by the photomicrographs, where in the case of preparation after 12 weeks of staying within the biological body, carbon fibres are mostly hidden within the polymer matrix, and only rarely some pores left by the resorbed polymer can be seen (FIG.3a). On the other hand, the photomicrograph obtained 24 weeks past the implantation (FIG.3b), the polymer is virtually invisible, carbon fibres become fully

disengaged, and bone tissue (EDS analysis) starts to grow into empty spaces among them. Large part of implant enters the bone marrow, therefore the EDS analysis proves that the tissue is rich in oxygen and carbon. The marrow-implant border is dominantly made of connective tissue, which is confirmed by increased oxygen and carbon content. The photomicrograph of preparation after a year long incubation (FIG.3c) shows carbon fibres interweaved by bone tissue, although the latter is still rich in oxygen. The process of bone tissue growth initiates at the exposed fibre surfaces, which is shown by FIG.3d, where the secretion agglomerates on fibres are rich in calcium and phosphor (EDS point analysis). Carbon fibres, by initiating the in-growth of bone tissue, allow for its growth in the entire volume of the material, as opposed to pure PGLA material, where the bone tissue grows gradually starting from the bone-implant border.

The activation of intensive bone tissue formation process around the implant is the characteristic property of implants containing carbon fibres. The picture of preparation after 3 weeks of implantation (FIG.4a) already shows the bright strip of bone tissue surrounding the implant and crossing the marrow canal. Such phenomenon was not observed in the case of pure polymer. After 48 weeks of implantation carbon fibres become spread within the interweaving tissue, losing their regular cylindrical shape (FIG.4b).

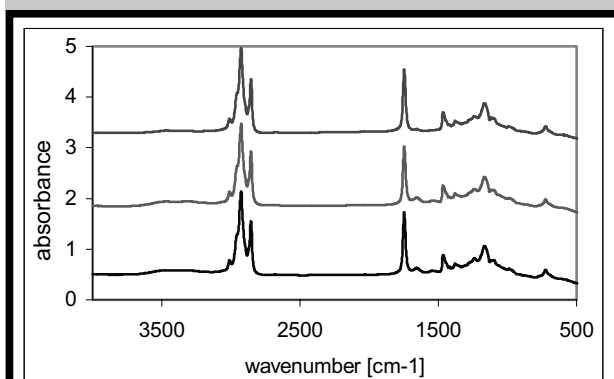
The infra-red FTIR spectra also allow to follow the polymer degradation process and the replacement of implant by the bone tissue. These spectra were obtained for implant surfaces directly contacting the bone tissue. In the case of PGLA+CF composite (FIG.5), weak gradual polymer resorption occurs until the 12th week, which is confirmed by the changes of intensity of bands originating from CH2

wione przez zresorbowany polimer (RYS.3a). Natomiast na mikrofotografii otrzymanej po 24 tygodniach implantacji (Rys.3b) polimer jest już niezauważalny, włókna węglowe są całkowicie uwolnione, a w pustej przestrzeni między nimi zaczyna wrastać tkanka kostna (analiza EDS). Implant w dużym stopniu znajduje się w szpiku kostnym dlatego analiza EDS wykazała, że tkanka bogata jest w tlen i węgiel. Granica szpik - implant to przede wszystkim tkanka łączna, o czym świadczy zwiększona zawartość tlenu i węgla. Na mikrofotografii preparatu po rocznej inkubacji (RYS.3c) włókna węglowe są już całkowicie przetrąsnięte tkanką kostną, choć jest ona jeszcze bogata w tlen. Proces narastania tkanki kostnej rozpoczyna się na odsłoniętych powierzchniach włókien, co pokazuje Rys.3d, gdzie tworzące się skupiska wydzielenia na włóknach bogate są w wapń i fosfor (analiza punktowa EDS). Włókna węglowe inicjując narastanie tkanki kostnej umożliwiają jej wzrost w całej objętości materiału, w przeciwieństwie do czystego PGLA, gdzie tkanka kostna narasta stopniowo od granicy kość-implant. Charakterystyczną właściwością implantów z włóknem węglowym jest aktywowanie procesu wzmożonego tworzenia tkanki kostnej wokół implantu. Na zdjęciu preparatu po 3 tygodniach implantacji (Rys.4a) już widoczny jest jasny pas tkanki kostnej otaczający implant i biegnący w poprzek kanału szpikowego. Zjawisko to nie było widoczne w przypadku czystego polimeru. Po 48 tygodniach implantacji nie



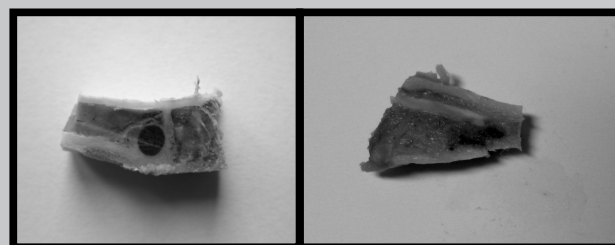
RYS. 5. Widmo FTIR implantów PGLA+CF: 1-PGLA+CF przed implantacją, 2-PGLA+CF po 6, 3-po 12, 4-po 24, 5-48 tygodniach implantacji, 6-kość uda.

FIG. 5. The FTIR spectra for PGLA+CF implants in thigh bone: 1-PGLA+CF before implantation, 2-PGLA+CF after 6, 3-after 12, 4-after 24, 5-after 48 weeks of implantation, 6- thigh bone.



RYS. 6. Widmo FTIR implantu PGLA+CF po 48 tygodniach implantacji: 1-środek implantu, 2-powierzchnia implantu, 3-tkanka przy implancie.

FIG. 6. The FTIR spectra of PGLA+CF implants after 48 weeks of implantation: 1-implant's centre, 2-implant's surface, 3-tissue close to implant.

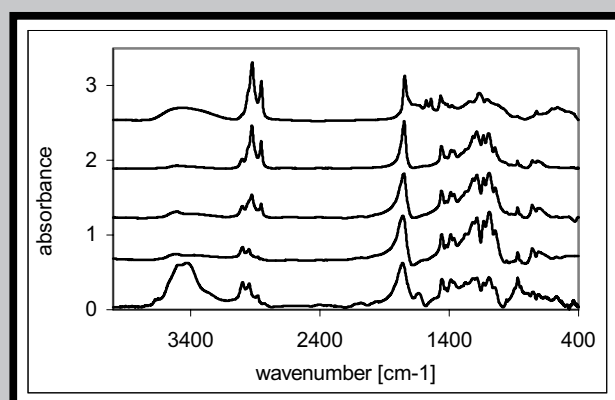


RYS. 4. Fotografie implantów PGLA+CF w kości udowej królika: a) po 3, b) po 48 tygodniach implantacji.

FIG. 4. The PGLA+CF implant photographs within the rabbit thigh bone: a) after 3, b) after 48 weeks of implantation.

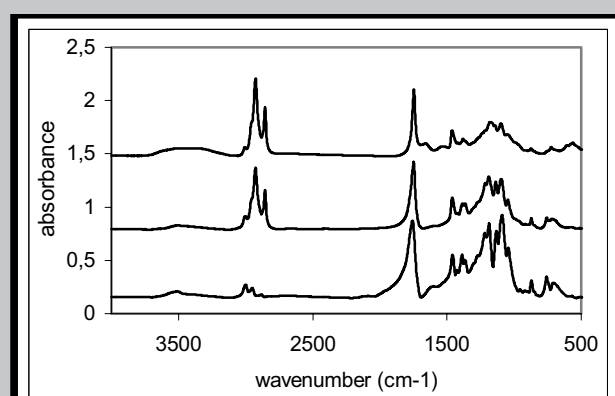
and CH3 groups. After 24 weeks the bands typical of bone tissue appear. This effect is visible not only at the bone-implant border, but also in the central part of the implant (FIG.6). In pure PGLA, after 1 week of implantation already (FIG.7), the reduction of intensity of bands related to CH₂, CH₃ groups is clearly visible, and between the 3rd and 6th week the implant spectrum becomes similar to the spectrum of bone tissue (FIG.8).

The shear-strength tests of bone-implant border were performed using push-out method, and they confirm different resorption time of pure polymer and its composite with carbon fibres. The shear-strength decrease related to polymer



RYS. 7. Widmo FTIR implantów PGLA: 1-PGLA przed implantacją, 2-PGLA po 1, 3-po 3, 4-po 6 tygodniach implantacji, 5-kość uda.

FIG. 7. The FTIR spectra for PGLA implants: 1-PGLA before implantation, 2-PGLA after 1, 3- after 3, 4-after 6 weeks of implantation, 5-thigh bone.



RYS. 8. Widmo FTIR implantu PGLA po 6 tygodniach implantacji: 1-środek implantu, 2-powierzchnia implantu, 3-tkanka przy implancie.

FIG. 8. The FTIR spectra of PGLA implant after 6 weeks of implantation: 1-implant's centre, 2-implant's surface, 3-tissue near implant.

włókna węglowe rozprzestrzeniły się w przerastającej je tkance tracąc regularny kształt walca (RYS.4b).

Proces degradacji polimeru oraz zastępowania implantu tkanką kostną pozwalają również śledzić widma otrzymane metodą spektroskopii w podczerwieni - FTIR. Widma te uzyskane są dla powierzchni implantu bezpośrednio stykającej się z tkanką kostną. W przypadku kompozytu PGLA+CF (RYS.5), do 12 tygodnia następuje stopniowa resorpcja polimeru, co potwierdzają zmiany intensywności pasm pochodzących od grup CH_2 , CH_3 . Po 24 tygodniach pojawiają się pasma charakterystyczne dla tkanki kostnej. Efekt ten widoczny jest nie tylko na styku implant-kość, ale także w środkowej części implantu (RYS.6).

Dla czystego PGLA już po 1 tygodniu implantacji (RYS.7) wyraźnie widoczne jest zmniejszenie intensywności pasm związanych z grupami CH_2 , CH_3 , a między 3 a 6 tygodniem widmo implantu coraz bardziej zbliża się do widma tkanki kostnej (RYS.8).

Badania wytrzymałości na ścinanie granicy kość-implant przeprowadzone metodą push-out potwierdzają zróżnicowany czas resorpcji czystego polimeru i jego kompozytu z włóknami węglowymi. Związany z resorpcją polimeru spadek wytrzymałości na ścinanie oraz następujący po nim wzrost tej wytrzymałości, związany z procesem przerastania implantu tkanką kostną występuje w krótszym czasie w przypadku czystego polimeru (TAB.1). W przypadku czystego polimeru największa wartość wytrzymałości na ścinanie granicy kość-implant przypada na 6 tydzień implantacji, dla którego zdjęcia SEM pokazywały implant z porami przerośniętymi tkanką. Następujący po tym okresie spadek wytrzymałości granicy może być związany z utratą ciągłości implantu oraz z faktem, że tkanką przerastającą implant jest miękka tkanka łączna. W przypadku kompozytu natomiast, wytrzymałość po przerośnięciu włókien wyraźnie wzrosła prawdopodobnie w wyniku omówionego wyżej wzmożonego tworzenia tkanki kostnej w okolicach wszczepu węglowego.

Wnioski

Czas resorpcji określony w warunkach in vitro ulega zmianie w wyniku przebywania polimeru w środowisku organizmu żywego. Zmiana ta może być w dużej mierze wywołana selektywną adsorpcją białek oraz różnymi warunkami miejsca implantacji (pH, naprężenia). W badaniach in vivo, przy zastosowaniu implantu PGLA proces resorpcji rozpoczyna się wcześniej i biegnie równocześnie z procesem narastania tkanki kostnej. Tkanka ta narasta stopniowo od granicy kość-implant. W tworzącej się tkance dominuje przede wszystkim tkanka łączna. W przypadku kompozytu PGLA+CF możliwy jest w początkowym etapie proces resorpcji polimeru na powierzchni implantu i przerastanie odsłoniętych na powierzchni włókien tkanką. W dalszej kolejności proces resorpcji zaczyna obejmować również środek implantu. Tworzenie tkanki kostnej rozpoczyna się na powierzchni włókien w całej objętości materiału. Dodatkowo włókna węglowe inicjują proces wzmożonego tworzenia tkanki kostnej wokół implantu.

Podziękowania

Niniejsza praca stanowi część projektu badawczego: PBZ-KBN-082/T08/2002/26, finansowanego przez Ministra Nauki i Informatyzacji

tydzień implantacji week of implantation	wytrzymałość dla implantu PGLA+CF strength for implant PGLA+CF ó [MPa]	wytrzymałość dla implantu PGLA strength for implant PGLA ó [MPa]
1	0,82	1,46
2	2,88	1,81
3	4,63	0,26
12	0,51	3,45
24	2,94	0,23
48	8,17	0,12

TABELA 1. Wytrzymałość wiązania kość-implant w funkcji czasu implantacji, określona na podstawie testu push-out.

TABLE 1: Strength of bone-implant bond as a function of implantation time, determined on the basis of push-out test.

resorption, followed by increase of this strength due to bone tissue interweaving, occurs during shorter period in the case of pure polymer (TABLE1). For pure polymer the highest shear-strength value appears during the 6th week of implantation, for which the SEM micrographs showed implant with pores overgrown with tissue. The shear-strength decrease occurring after this period may be related to loss of implant's continuity, together with the fact that the tissue interweaving the implant is dominantly made of soft connective tissue. In the case of composite, the strength after fibre interweaving increased significantly, probably as a result of above discussed intensive bone tissue formation at the proximity of carbonaceous implant.

Conclusions

The time of resorption determined under in vitro conditions changes when the polymer remains in the living body environment. This change may be caused, to a large extent, by selective adsorption of proteins and different conditions in the area of implantation (pH, stresses). During the in vivo examination using pure PGLA implant, the resorption process starts earlier and it continues simultaneously with bone tissue growth process. This growth of tissue gradually starts from the bone-implant border, and the connective tissue dominates the volume of tissue being formed. In the case of PGLA+CF composite the processes of polymer resorption on implant surface, together with overgrowing of tissue with exposed fibre surfaces, are both likely to occur within the initial stages. In the following stages the resorption process spreads into the implant's interior. Additionally, carbon fibres initiate intensive formation of bone tissue around the implant.

Acknowledgements

This work was carried out as part of research project: PBZ-KBN-082/T08/2002/26, financed by the Minister of Science and Information Society Technologies.

- [1] Chłopek J., Kmita G.: Non-metallic composite materials for bone surgery, *Engineering Transaction* (2003), vol. 51 iss. 2-3:307-323.
- [2] An Y.H., Woolf S.K., Friedman R.J.: Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices, *Biomaterials* (2000), 21:2635-52.
- [3] Seal B.L., Otero T.C., Panitch A.: Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Mat.Sci.Eng.R.* (2001), 34:147-230.
- [4] Chłopek J., Pamuła E., Błażewicz M., Makinen K.: Composite materials from a new biodegradable glycolide-lactide copolymer for medical applications, *Inżynieria Biomateriałów* (2000), R.3 nr 12:23-28.
- [5] Pitt C.G., Gratzel M.M., Kimmel G.L., Surles J., Schindler A.: Aliphatic polyesters. 2. The degradation of poly(DL-lactide), poly(e-caprolactone) and the copolymers in vivo, *Biomaterials* (1981), 2:215-20.

WPŁYW WARSTW POŚREDNICH SiO_2 I $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ NA PRZYCZEPNOŚĆ STOP TYTANU Ti6Al4V-PORCELANA DENTYSTYCZNA

JAROSŁAW BIENIAŚ*, BARBARA SUROWSKA*,
MARIUSZ WALCZAK*, ANNA STOCH**, HALINA MATRASZEK***

*KATEDRA INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ, POLITECHNIKA LUBELSKA, LUBLIN

**WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI, AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA, KRAKÓW

***KATEDRA PROTETYKI STOMATOLOGICZNEJ, COLLEGIUM MEDICUM, UNIwersytet Jagielloński, KRAKÓW

[*Inżynieria Biomateriałów*, 47-53,(2005),202-204]

Wprowadzenie

W ostatnich latach w zakresie biomateriałów stomatologicznych prowadzone są intensywne prace badawcze związane z kształtowaniem warstwy wierzchniej implantu m.in. poprzez wytworzenie warstw pośrednich pomiędzy metalem bazowym a porcelaną dentystyczną o korzystnych właściwościach chemicznych i fizycznych. Wynika to głównie z odnotowywanej, niewystarczającej przyczepności powłoki porcelanowej do metalu bazowego, głównie tytanu i jego stopów [1,2].

Coraz szersze zastosowanie znajdują bioceramiczne powłoki SiO_2 i $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ wytwarzane metodą zol-żel, odznaczające się szeregiem zalet tj.: możliwość wytwarzania powłok jedno jak i wieloskładnikowych oraz wielowarstwowych, niska grubość, wysoka homogeniczność struktury, a także stabilność chemiczna i mechaniczna [3,4].

W pracy przedstawiono wyniki badań przyczepności układu: stop Ti6Al4V-niskotopliwa porcelana dentystyczna z zastosowaniem warstw pośrednich SiO_2 i $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ wytworzonych metodą zol-żel.

Materiał i metody

Badania przyczepności przeprowadzono zgodnie z normą PN-EN ISO 9693 metodą trzypunktowego zginania. Do badań jako metal bazowy wykorzystano stop Ti6Al4VELI (ASTM-grade 5) o wymiarach $25 \times 3 \times 0.5 \text{ mm}$. Na powierzchni stopu wytworzono warstwy pośrednie SiO_2 oraz $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$

References

- [6] Rizzi S.C., Heath D.J., Coobes A.G., Bock N., Textor M., Downes S.: Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblast, *J.Bio-med.Mater.Res.* (2001), 55:475-86.
- [7] Furukawa T., Matsusue Y., Yasunaga T., Shikunami Y., Okuno M., Nakamura T.: Biodegradation behaviour of ultra-high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures, *Biomaterials* (2000), 21:889-98.
- [8] Błażewicz M.: Carbon materials in the treatment of soft and hard tissue injuries, *European Cells and Materials* (2001), 2:21-29.
- [9] J.Chłopek, A.Morawska, L.Umańska, C.Paluszkiwicz: Badanie procesu degradacji kompozytów z polimerów resorbowalnych w warunkach in vitro, *Inżynieria Biomateriałów* (2004), Nr38-42:132-136.

THE INFLUENCE OF SiO_2 AND $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ INTERMEDIATE COATINGS ON ADHESION OF Ti6Al4V TITANIUM ALLOY - DENTAL PORCELAIN

JAROSŁAW BIENIAŚ*, BARBARA SUROWSKA*,
MARIUSZ WALCZAK*, ANNA STOCH**, HALINA MATRASZEK***

*DEPARTMENT OF MATERIALS SCIENCE, LUBLIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, LUBLIN

**FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS, UNIVERSITY OF MINING AND METALLURGY, KRAKÓW

***DEPARTMENT OF ESTABLISHMENT OF DENTAL PROSTHETICS, COLLEGIUM MEDICUM, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, KRAKÓW

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),202-204]

Introduction

In the recent years, within the range of dentistry biomaterials intensive study is being conducted on the modification of surface layer of implants including production by intermediate coatings with advantageous chemical and physical properties between substrate metals and dental porcelain. This arises mainly from the observed insufficient adhesion of porcelain coating to substrate metal particularly of titanium and titanium alloys [1,2].

At present, SiO_2 and $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ bioceramic coatings produced by sol-gel method find wide application. These intermediate coatings are characterised by the possibility to manufacture both mono- and multicomponents also multilayers, low thickness, high homogeneity, and mechanical and chemical stability [3,4].

The aim of this work is to present a study of adhesion of: Ti6Al4V alloy-low-fusing dental porcelain with the use of SiO_2 and $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ intermediate coatings produced by sol-gel method.

Material and method

The adhesion tests according to PN-EN ISO 9693 standards three-point bending test were investigated. Titanium Ti6Al4VELI alloy (ASTM-grade 5) was used. The SiO_2 and $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ intermediate coatings on the surface of alloy (samples $25 \times 3 \times 0.5 \text{ mm}$) by sol-gel method were manufactured. Next, in the middle part of samples ($8 \times 3 \times 1 \text{ mm}$) Triceram

metodami zol-żel, a następnie w części środkowej próbki ($8 \times 3 \times 1 \text{ mm}$) napalono niskotopliwą porcelanę dentystyczną Triceram (firmy Dentaaurum). Testy wytrzymałościowe prowadzono z wykorzystaniem maszyny wytrzymałościowej Zwick Z100 (obciążenie 0.6 N , posuw 1.5 mm/min). Wytrzymałość połączenia (τ_b) określono z zależności:

$$\tau_b = k F_{\text{fail}} \quad (1)$$

gdzie: k jest współczynnikiem zależnym od grubości metalu bazowego i modułu Younga (dla Ti6Al4V wynosi on 4.7), a F_{fail} jest siłą powodującą utratę połączenia metal-ceramika.

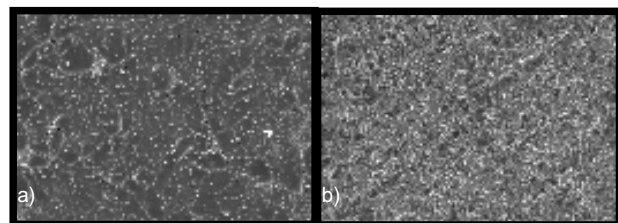
Wyniki badań i dyskusja

Mikrostrukturę powłok SiO_2 i $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ wytworzonych metodą zol-żel na stopie tytanu Ti6Al4V przedstawia RYS. 1. Struktura powłok SiO_2 i $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ jest zwarta i jednorodna chemicznie. W powłoce SiO_2 widoczne są liczne pęknięcia. Grubość warstw przejściowych waha się od 3 do $5 \mu\text{m}$. Chropowatość (R_a) powłoki SiO_2 wynosi $0.63 \mu\text{m}$, a $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ - $0.82 \mu\text{m}$.

Wyniki przeprowadzonych badań przyczepności układu metal-warstwa przejściowa-porcelana przedstawia TABELA 1. Zgodnie z normą PN-EN ISO 9693 porcelana dentystyczna napalana na metalowe podłoże powinna osiągnąć wartość minimalną wytrzymałości połączenia wynoszącą 25 MPa . Najwyższe wartości wytrzymałości połączenia metal-porcelana uzyskano stosując na stopie Ti6Al4V warstwę przejściową $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$, najniższe natomiast w przypadku stopu tytanu poddanemu jedynie konwencjonalnemu przygotowaniu podłoża-piaskowaniu. W przypadku powłoki $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ uzyskano 28% wzrost wytrzymałości połączenia w stosunku do układu Ti6Al4V-porcelana bez warstw przejściowych, natomiast w przypadku powłoki SiO_2 wzrost ten wynosi 14% .

Dane literaturowe [5] wskazują, że na zmniejszenie przyczepności połączenia pomiędzy metalowym podłożem-tytanem a porcelaną dentystyczną (odnotowaną również w przeprowadzonych badaniach) wpływ odgrywa głównie niedopasowanie współczynników rozszerzalności cieplnej porcelany i tytanu, a także reaktywność tytanu z tlenem podczas procesu napalania porcelany (tworzenie się na jego powierzchni warstwy TiO_2 powodującej obniżenie wytrzymałości połączenia tytan-porcelana).

Według badań własnych autorów oraz danych literaturowych [6-8] warstwy SiO_2 i $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ wykonane metodą zol-żel wykazują charakter dyfuzyjny, co wpływa pozytywnie na osiągnięcie dobrej przyczepności do metalu bazowego. W przypadku powłoki SiO_2 występujące na jej powierzchni pęknięcia, powstające na skutek skurczu podczas przeprowadzonej obróbki cieplnej stanowiąc dodatkowo mogą miejsca mechanicznych szczytów pomiędzy warstwą przejściową a napalaną porcelaną. Ponadto amorficzny lub bardzo nisko krystaliczny charakter nakładanych powłok SiO_2 po-



RYS. 1. Mikrostruktura warstw przejściowych na stopie Ti6Al4V; (a) SiO_2 i (b) $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$.

FIG. 1. Microstructure of intermediate coatings on Ti6Al4V alloy; (a) SiO_2 and (b) $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$.

(Dentaaurum) low-fusing dental porcelain were fired. The bond test was performed with the use of Zwick Z100 universal testing machine (force: 0.6 N , feed: 1.5 mm/min).

The bond strength (τ_b) was calculated using the equation:

$$\tau_b = k F_{\text{fail}} \quad (1)$$

where: the coefficient k is a function of the thickness of the metal substrate and the value of Young's modulus (for Ti6Al4V is 4.7). Then F_{fail} is fracture force causing the loss of joint of metal-porcelain.

Results and discussion

The microstructures of the SiO_2 and $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ coatings on Ti6Al4V alloy are presented in FIG. 1. The SiO_2 and $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ coatings are compact and chemically homogeneous. In the microstructure of SiO_2 coating, numerous microcracks were observed. The thickness of the intermediate coatings were about $3\text{-}5 \mu\text{m}$. The coatings have the value of the roughness factor R_a equal to $0.63 \mu\text{m}$ for SiO_2 and $0.82 \mu\text{m}$ for $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$.

Results of the three-point bending test of metal-intermediate coating-dental porcelain are presented in TABLE 1. According to PN-EN ISO 9623 standards, the bond strength of the ceramic should be greater than 25 MPa . The highest value of bond strength of metal-dental porcelain, was observed with the use of $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ intermediate coating, on Ti6Al4V alloy, whereas, in the case sand blasted titanium alloy the lowest value were observed. In the case of $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ intermediate coating, 28% increase of bond strength was achieved in comparison with Ti6Al4V-dental porcelain without intermediate coatings, whereas in the case of SiO_2 coating the increase of 14% was observed.

According to [5], the decrease of the bond strength between metal substrate-titanium and dental porcelain was caused mainly by (also in this study) the influence the mismatch of coefficients of thermal expansion titanium and dental porcelain, and the reactivity of titanium with oxygen during the firing of dental porcelain. On the surface of titanium the layer of TiO_2 is formed causing the decrease of bond strength titanium-porcelain.

According to the author's study and literature data [6-8], SiO_2 and $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ coatings manufactured by sol-gel method show diffusive character, which has a positive influence on influence on the adhesion to metal substrate. Numerous microcracks observed in the microstructure of SiO_2 coating, formed due to shrinkage in the process of thermal treatment, can become the points of "mechanical interlocking" between intermediate coating and dental porcelain. The amorphous or very low crystalline character of silica deposits favours their high chemical reactivity with the porcelain enamel, ensuring bonds of high mechanical strength [8].

The higher value of the roughness of $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ coatings has an influence on the increase of bond strength of metal-

	Wartość siły Fracture force F_{fail} [N]	Wytrzymałość połączenia Bond strength [MPa]
Ti6Al4V	6 ± 0.8	28.2 ± 3.7
Ti6Al4V/ SiO_2	6.8 ± 0.5	32.2 ± 2.1
Ti6Al4V/ $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$	7.7 ± 0.5	36.1 ± 2.6

TABELA 1. Wyniki badań przyczepności układu: stop Ti6Al4V-porcelana.

TABLE 1. Results of the three-point bending test Ti6Al4V alloy-dental porcelain.

woduje ich dobrą reaktywność chemiczną z szklivem porcelany, zapewniając połączenie o dużej wytrzymałości mechanicznej [8]. Uzyskanie większej chropowatości w przypadku powłok $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$, a tym samym większe rozwinięcie powierzchni, wpływa na wzrost wytrzymałości połączenia układu tytan-warstwa przejściowa-porcelana. Korzystną cechą wpływającą na otrzymanie trwałego połączenia układu $\text{Ti6Al4V/SiO}_2\text{-TiO}_2$ /porcelana wydaje się być także uzyskanie struktury kompozytowej warstwy przejściowej $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ składającej się z cząsteczek SiO_2 w osnowie TiO_2 . Obserwacje SEM (RYS.2) po przeprowadzonych badaniach przyczepności wskazują na uzyskanie połączenia o dobrych właściwościach adhezyjnych stopu tytanu-warstwa przejściowa-porcelana. Utratę połączenia (pęknięcia) odnotowano na powierzchni rozdziału warstwa przejściowa-porcelana (opaker).

Wnioski

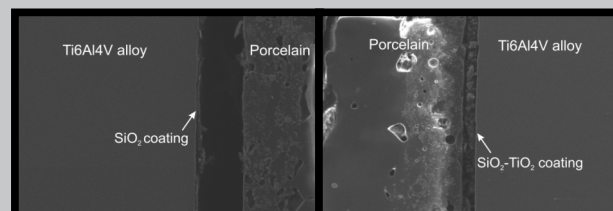
- (1) zastosowanie warstw przejściowych SiO_2 i $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ wytworzonych metodą zol-żel na stopie tytanu Ti6Al4V wpływa korzystnie na zwiększenie wytrzymałości połączenia metal-porcelana w porównaniu do stopu tytanu poddanego standardowej obróbce piaskowania. Dla powłoki $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ wzrost wynosi 28%, a dla warstwy przejściowej SiO_2 14%.
- (2) na zwiększenie wytrzymałości połączenia Ti6Al4V /warstwa przejściowa-porcelana wpływa topografia powierzchni: chropowatość, drobne pęknięcia, a także struktura warstw przejściowych: amorficzna SiO_2 i w szczególności kompozytowa warstwa $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$.

Podziękowania

Praca naukowa finansowana ze środków Komitetu Badań Naukowych w latach 2002-2005 jako projekt badawczy 4 T08A 045 23.

Piśmiennictwo

- [1] Suansuwan N., Sawin M.V.: Adhesion of porcelain to titanium and a titanium alloy. *Journal of Dentistry* 31, 2003, 509-518.
- [2] Cai Z., Bunce N., Nunc M.E., Okabe T.: Porcelain adherence to dental cast CP titanium: effects of surface modifications. *Biomaterials* 22, 2001, 979-986.
- [3] Matraszek H., Stoch., Paluszkiewicz Cz., Brożek A.: Zastosowanie metody zol-żel w praktyce dentystycznej. *Inżynieria Biomateriałów* 23-25, 2002, 72.
- [4] Viswanath R.N., Ramasamy S., Study of TiO_2 nanocrystallites in $\text{TiO}_2\text{-SiO}_2$ composites, *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 133, 1998, 49-56.



RYS. 2. Struktura połączenia po badaniach przyczepności (a) Ti6Al4V/SiO_2 /porcelana, (b) $\text{Ti6Al4V/SiO}_2\text{-TiO}_2$ /porcelana.

FIG. 2. Structure of joint after three-point bending test (a) Ti6Al4V/SiO_2 /porcelain, (b) $\text{Ti6Al4V/SiO}_2\text{-TiO}_2$ /porcelain.

intermediate coating-porcelain. What positively affects the durability of joint $\text{Ti6Al4V/SiO}_2\text{-TiO}_2$ /porcelain could be caused by the composite structure of $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ containing SiO_2 particles in the TiO_2 matrix.

SEM analysis (FIG.2), after three-point bending test, indicate that joint with good adhesion properties of titanium alloy-intermediate coating-porcelain was obtained. The loss of joint (cracks) was observed on intermediate coating-porcelain (opacer) interface.

Conclusions

- (1) the application of SiO_2 and $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$ intermediate coatings produced by sol-gel method on Ti6Al4V alloy has an advantageous influence on the increase of bond strength of metal-porcelain in comparison with titanium alloy after sand blasting.
- (2) the increase of bond strength of Ti6Al4V /intermediate coating-porcelain was dependent on the surface topography of intermediate coatings: roughness, fine cracks and the structure of intermediate coating: amorphous SiO_2 and particularly the composite of $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$.

Acknowledgement

The work was financed by State Committee for Scientific Research (grant No. 4T08A04523).

References

- [5] Pang Iok-Chao, Gilbert J.L., Chai J., Lautenschlager E.P.: Bonding characteristics of low-fusing porcelain bonded to pure titanium and palladium-copper alloy. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 73,1, 1995, 17-25
- [6] Paluszkiewicz Cz., Stoch A., FT-IR microscopic imaging of metal-ceramics joint. *Vibrational Spectroscopy* 35, 2004, 183-187.
- [7] Michalik R., Łaskawiec J., Klisch M., Powłoki ochronne wytwarzane metodą zol-żel na implantach, *Inżynieria Materiałowa* 5, 2002, 372-375.
- [8] Surowska B., Bieniaś J., Walczak M., Sangwal K., Stoch A.: Microstructure and mechanical properties of ceramic coatings on Ti and Ti-based alloy. *Applied Surface Science* 238, 2004, 288-294.

BEZPIECZEŃSTWO I SKUTECZNOŚĆ WYBIELANIA ZĘBÓW Z ŻYWĄ MIAZGĄ MATERIAŁEM PEROX 10%

D.KOŚCIELNIAK*, H.KWAPIŃSKA*, M.CHOMYSZYN-GAJEWSKA**

UNIwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Instytut
Stomatologii, ul. Montelupich 4, 31-155 Kraków

*Pracownia Stomatologii Dziecięcej

**Katedra i Zakład Periodontologii i Klinicznej Patologii
Jam Ustnej

Streszczenie

W badaniu oceniono skuteczność i bezpieczeństwo wybielania zębów z żywą miazgą preparatem Perox 10%. U 13 pacjentów zastosowano wybielanie metodą nocną, nakładkową. Średni czas wybielania wynosił 20 dni. Poprawę koloru zębów uzyskano u wszystkich pacjentów w granicach od 4 do 10 w 16 punktowej skali VITA, ze średnią 5,9 punktów. U 69,2% pacjentów wystąpiła przemijająca nadwrażliwość zębów na bodźce cieplne. Metodę wybielania nakładkowego materiałem Perox 10% oceniono jako skuteczną i bezpieczną, a sam materiał uzyskał wysoką ocenę użytkową.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),205-209]

Wprowadzenie

Wybielanie nakładkowe (nightguard bleaching) jest obecnie najczęstszą metodą wybielania zębów z żywą miazgą. Jest to metoda zlecana i nadzorowana przez stomatologa, a wykonywana w domu samodzielnie przez pacjenta. Materiał wybielający aplikowany jest przy pomocy wykonanej wcześniej indywidualnej nakładki (szyny) [1,2,3]. Wybielanie możliwe jest w prawie każdym przypadku, gdy mamy do czynienia ze zdrowym uzębieniem, niezależnie od liczby istniejących wypełnień. Wskazaniem do przeprowadzenia tego zabiegu są przebarwienia zębów spowodowane przez [4]:

- barwniki pochodzące z pokarmów, napojów oraz tytoniu, których nie można usunąć w ramach zabiegów profesjonalnego czyszczenia zębów
- zmiany związane z procesem starzenia się
- przyjmowanie antybiotyków tetracyklinowych (zmiany pierwszego i drugiego stopnia)
- fluorozę, szczególnie o brązowym zabarwieniu
- martwicę i zgorzel miazgi
- genetycznie uwarunkowany ciemny odcień zębów

Aktywnym składnikiem żelu wybielającego stosowanego w metodzie wybielania nakładkowego może być nadtlenek wodoru w stężeniach od 3 % do 7.5 % lub nadtlenek mocznika ($\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$) w stężeniach od 10 % do 22 %. Wybielanie nakładkowe przeprowadza się w ciągu dnia przez minimum 2 godziny lub w czasie nocnego spoczynku. W celu uzyskania oczekiwanego efektu szynę z żelem stosuje się przeciętnie od 2 do 4 tygodni. Uzależnione jest to od charakteru przebarwienia. Z dotychczasowych badań wynika, że nie wszystkie rodzaje przebarwień zębów mogą być efektywnie wybielane tą metodą. Można liczyć na jej skuteczność średnio w 92% bezpośrednio po wybielaniu, w 74 % po 1,5 roku, w 62 % po 3 latach i w 35 % po 7 latach [5,6,7]. Najczęstszymi objawami ubocznymi po stosowaniu nadtlenku mocznika w metodzie przyżyciowej, nakładkowej są:

SAFETY AND EFFICIENCY OF THE VITAL TEETH BLEACHING WITH PEROX 10%

205
.....

D.KOŚCIELNIAK*, H.KWAPIŃSKA*, M.CHOMYSZYN-GAJEWSKA**

JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM, INSTITUTE OF
DENTISTRY, UL. MONTELUPICH 4, 31-155 KRAKÓW

*DEPARTMENT OF PAEDIATRIC DENTISTRY,

**CHAIR AND DEPARTMENT OF PERIODONTOLOGY AND PATHOLOGY
OF THE ORAL CAVITY

Abstract

The study analyzed the efficiency and security of the vital teeth bleaching with the use of Perox 10%. Nightguard bleaching was applied to 13 patient. The average bleaching time was 20 days. The improvement of teeth colour, ranging from 4 to 10 - according to 16 levels VITA scale, was achieved. The average was 5,9 points. At 69,2% a transient teeth hypersensitivity to thermal stimuli was observed. Nightguard teeth bleaching with the use of Perox 10% was rated as efficient and safe, and the material achieved a high usage rate.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),205-209]

Introduction

Nightguard bleaching is nowadays the most often used vital teeth bleaching method. This method is prescribed and controlled by a dentist, but performed by a patient at home. The bleaching material is applied with the use of previously made individual splint [1,2,3].

Teeth bleaching is possible in almost all cases, while teeth are vital, irrespective of the amount of fillings. The indications for teeth bleaching are discolorations caused by [4]:

- Dyes originating from food, beverages, tobacco which are not removable by professional teeth cleaning
- Changes connected with ageing
- Tetracycline antibiotics administration (1st and 2nd degree changes)
- Fluorosis, especially brown coloured
- Necrosis and gangrene of the pulp
- Genetically qualified dark teeth colour

The active ingredient of bleaching gel which is used in nightguard bleaching may be hydrogen peroxide in concentrations of 3 % to 7.5 % or carbamide peroxide ($\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$) in concentrations of 10 % to 22 %. Nightguard bleaching is performed during the day for minimally 2 hours or during night sleep. In order to achieve a desirable effect the splint with gel should be applied from 2 to 4 weeks. The application time is dependent on the character of the discoloration. Studies which have been published until now indicate that not all types of discolorations may be treated with the use of described method. The effectiveness which you may count on is 92 % directly after bleaching, 74 % after 1,5 year, 62 % after 3 years, 35 % after 7 years [5, 6, 7].

The most frequent side symptoms observed after the use of urea peroxide in vital teeth bleaching by nightguard method are: teeth hypersensitivity and gingiva irritation, which may be observed even at 66% of patients. Other complications are observed extremely rarely. Those include: throat, teeth, temporo-mandibular joint pains, headaches or numbness of soft tissues [2,8,9].

The aim of this study was to evaluate the efficiency, the comfort of treatment and side effects of vital teeth bleach-

wrażliwość zębów i podrażnienia dziąseł, które występują nawet u 66% pacjentów. Inne powikłania spotyka się niezwykle rzadko. Należą do nich: bóle gardła, zębów, stawu skroniowo-żuchwowego, głowy czy mrowienie tkanek miękkich [2,8,9].

Celem niniejszej pracy była ocena skuteczności, komfortu zabiegu oraz objawów ubocznych wybielania zębów metodą nakładkową materiałem Perox 10%.

Materiał i metoda

Zastosowano preparat Perox 10% (Chema-Elektromet, Rzeszów, Polska) o składzie: 10% nadtlenu mocznika, karbomer, glikol propylenowy, glicerol, wodorotlenek sodu, woda oczyszczona, aromat miętowy, (pH=6.7). Materiał kliniczny do badań stanowiło 13 pacjentów w wieku od 21 do 53 lat, w tym 8 kobiet (61,54%) i 5 mężczyzn (38,46%). W większości przypadków wybielanie dotyczyło obu łuków zębowych; tylko u jednego pacjenta wybielano zęby szczęki.

Przed leczeniem opisano kartę pacjenta, w której zarejestrowano: dane osobowe, stan uzębienia i potrzeby lecznicze, pochodzenie przebarwienia, stan błony śluzowej i dziąseł, warunki zgryzowe.

Analizowano także zdjęcia rentgenowskie panoramiczne, zalecając w uzasadnionych przypadkach wykonanie dodatkowych zdjęć wewnątrzustnych.

Leczenie rozpoczynano od dokładnego oczyszczania profesjonalnego zębów (skaling naddziąsłowy) oraz polerowania powierzchni przy pomocy szczoteczek i gumek, oraz pasty Chema Polish. W niektórych przypadkach stosowano piaskarkę do oczyszczania i polerowania trudno dostępnych powierzchni. Następnie przeprowadzano fluoryzację stosując Fluormex żel lub lakier Fluor Protector.

Kolor zębów siecznych, kłów i przedtrzonowców oznaczano u pacjentów przed i po wybielaniu w oparciu o klucz kolorów wg. kolornika firmy VITA. Przed zabiegiem wybielania u wszystkich pacjentów wykonano fotografie uzębienia aparatem cyfrowym Canon G6.

Pacjenci otrzymali do wypełnienia ankietę wstępną składającą się z pytań na temat:

- sposobu utrzymania higieny jamy ustnej
- nawyków dietetycznych
- stosowanych leków, w tym antybiotyków
- dotychczasowych prób wybielania zębów
- oczekiwań co do efektu wybielania

Na pierwszej wizycie pobierano wyciski masą alginatową Cromopan. Nakładki do wybielania przygotowywano w Laboratorium Techniki Dentystycznej na modelach roboczych, których powierzchnie licowe zębów pokryte zostały żywicą blokującą Block Out Resin f. Ultradent. Wszystkie nakładki zostały wykonane z płytek winylowych Soft Trey Regular f. Ultradent przy pomocy formierza próżniowo-ciśnieniowego Erkopress ES-200E f. Erkodent.

Na kolejnej wizycie pacjenci otrzymywali nakładki wraz z opakowaniem preparatu Perox 10% (6 strzykawek po 2 ml., smak miętowy). Każdy pacjent został szczegółowo pouczony odnośnie sposobu i czasu stosowania preparatu, możliwości powikłań i postępowania w takich wypadkach. Wszyscy badani użytkowali żel wybielający podczas nocnego wypoczynku. Dobowy czas noszenia nakładki wahał się od 5 do 10 godzin, średnio 7,5 godziny. Całkowity czas wybielania wynosił od 14 do 35 dni. W dwóch przypadkach wybielano 4 zęby sieczne po leczeniu endodontycznym. Przez tydzień stosowano metodę zewnętrzno-wewnętrzzną, a następnie dodatkowo w dwóch zębach metodę wewnętrznego wybielania.

Po zakończeniu procesu wybielania pacjenci wypełniali ankietę końcową, w której odpowiadali na pytania dotyczą-

cing by nightguard method with the use of Perox 10%.

Material and methods

The Perox 10% (Chema-Elektromet, Rzeszów, Poland) comprising: 10% carbamide peroxide, carbomer, polypropylene glycol, glycerol, sodium hydroxide, pure water, menthol flavor, (pH=6.7) was used. Clinical material consisted of 13 patients aged 21 to 53 years, therein 8 women (61,54%) and 5 men (38,46%). Most cases concerned bleaching of two dental arches; only one patient had one maxillary teeth arch bleached.

Before the treatment a clinical record was made in which the following data was recorded: personal data, teeth condition and treatment needs, origin of discoloration, oral mucosa and gingiva condition, occlusal conditions.

Furthermore the analysis of intraoral and pantomographic X-rays was performed and, if necessary, accessory intraoral X-rays were prescribed.

The first stage of treatment was accurate professional teeth cleaning (supragingival scaling) and polishing with the use of brushes, rubbers and Chema Polish paste. In some cases the air-blaster was used to clean and polish the surfaces which were difficult to reach. Then the fluoridation was performed with the use of Fluormex gel or Fluorprotector.

The colour of incisors, canines and premolars was recorded before and after bleaching according to VITA colour scale. Before bleaching a photograph of teeth was taken with the use of a digital camera Canon G6.

Patients received an introductory questionnaire which consisted of the following questions concerning:

- Method of oral hygiene
- Dietary habits
- Administered drugs, including antibiotics
- Previously undertaken teeth bleaching
- Bleaching effect expectations

Furthermore on the first visit an impression was taken with the use of alginate impression material Cromopan. Bleaching splints were fabricated in Dental Laboratory according to a plaster model on which obverse surfaces of teeth were covered with Block Out Resin made by Ultradent. All splints were fabricated from vinyl plates Soft Treay Regular made by Ultradent with the use of a vacuum-pressure former Erkopress ES-200E made by Erkodent.

During the second clinical visit the patients received bleaching splints and a pack of Perox 10% (6 syringes of 2 ml each, menthol flavor). Each patient was instructed in detail about the way and time of the confection usage, possible complications and the procedure in such cases. All patients applied bleaching gel during night sleep time. The gel was applied for 5 to 10 hours a day, an average of 7,5 hours. The total bleaching time varied from 14 to 35 days. In two clinical cases 4 endodontically treated incisors were being bleached. An externally-internal method was used for a week, and then additionally, in two teeth the method of internal bleaching was applied.

When the bleaching process was finished patients filled in a final questionnaire which consisted of questions concerning the following:

- Satisfaction from the performed bleaching
- Rating of bleaching effect (6 level scale)
- Discomfort during treatment
- Teeth hypersensitivity
- Transformation of teeth surface

Results and discussion

The longest bleaching time application was essential in two cases of teeth discoloured by tetracyclines. It was re-

Płeć Sex	Wiek Age	Kolor przed wybieleniem Colour before	Kolor po wybieleniu Colour after	Różnica w punktach Change in points	Czas wybielenia Bleaching time	
					Dobowy godziny Hours per day	Całkowity dni Total days
M	53	C3	D4	6	8	14
K/F	33	A3,5	C1	6	7	21
K/F	28	D4	D2	4	6,5	21
M	32	D4	B2	5	7,5	28
K/F	30	D4	B2	4	5	20
M	23	D3	D2	6	10	20
K/F	29	D3	D2	6	7,5	16
K/F	28	A3	D2	6	6,5	14
M	25	A3,5	A1	10	8	21
K/F	23	A3	D2	5	8	21
K/F	21	C3	C1	8	7,5	35
M	26	A3,5	A2	7	7	14
K/F	37	B4	D2	4	8,5	14

TABELA 1. Wyniki indywidualnych pomiarów kolorów zębów.

TABLE 1. Results of individual measurements of teeth colour.

ce:

- satysfakcji z przeprowadzonego wybielenia
- oceny efektu rozjaśnienia (skala sześciopunktowa)
- dyskomfortu podczas leczenia
- wrażliwości zębów
- zmiany powierzchni zębów

Wyniki i dyskusja

Najdłuższy czas wybielenia potrzebny był w dwóch przypadkach przebarwień zębów po tetracyklinach. Wynosił on odpowiednio 28 i 35 dni. Zewnętrzne przebarwienia zębów wymagały stosowania żelu średnio 21 dni, a przebarwienia uwarunkowane genetycznie średnio 16 dni.

Ocena wyników wybielenia zębów była dokonywana zarówno przez lekarza jak i przez pacjentów. Lekarz stomatolog oceniał efekt zabiegu na podstawie skali VITA, obliczając różnicę uzyskaną z porównania kolorów przed i po leczeniu. Indywidualne wyniki pomiaru koloru zębów u pacjentów przed i po wybieleniu zestawiono w TABELI 1.

Z indywidualnych pomiarów u poszczególnych pacjentów wykonano zestawienie porównawcze dla wszystkich badanych (TABELA 2). Z tabeli tej wynika, że wartości koloru w badaniu wstępnym mieściły się w skali VITA między D4 i C3 tj. między numerem 8 i 14. Lokalizowały się one raczej po prawej stronie skali. Po leczeniu lokalizacja kolorów przesunęła się zdecydowanie na lewą stronę skali, mieszcząc się między 2 i 8 numerem skali VITA (od A1 do D4). Poprawę koloru zębów uzyskano u wszystkich pacjentów w gra-

Stopień Level	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Kolor Colour	B1	A1	B2	D2	A2	C1	C2	D4	A3	D3	B3	A3,5	B4	C3	A4	C4
Przed wybieleniem Before bleaching								3	2	2		3	1	2		
Po Wybieleniu After bleaching		1	2	6	1	2		1								

TABELA 2. Zestawienie koloru zębów u pacjentów przed i po leczeniu

TABLE 2. Comparison of teeth colour before and after treatment

spectively 28 and 35 days. It took on average 21 days of gel application to bleach discolourings of external origin and in the case of those genetically qualified it took on average 16 days.

The bleaching results estimation was done by both - patient and dentist. The dentist estimated the results basing on VITA scale by calculating the difference achieved from the comparison of colours before and after bleaching. Individual results of teeth colour measurements before and after bleaching have been summarized in TABLE 1.

Basing on individual measurements the authors have made a comparison including the whole study group (TABLE 2). This comparison revealed that initial teeth colours ranged from D4 to C3 according to VITA scale, which is between number 8 and 14. They were localized mostly on the right side of the scale. The end treatment teeth colours moved to the left side of the scale, ranging from 2 to 8 according to VITA scale (from A1 to D4). The improvement of teeth colour was achieved in all patients - it ranged from 4 to 10 points in 16 levels VITA scale, with the average of 5,9 points. The comparison of individual colours before and after treatment is shown in TABLE 3. It reveals that results achieved for maxillary teeth were better (average 7 points) than for mandibular teeth (average 5,3 points). The best bleaching effect was observed in upper canines, the worst in lower incisors.

When the treatment was finished the patients evaluated its results by granting points from 1 (unsatisfactory) to 6 (excellent). Marks good (4) and very good (5) were granted by 11 persons and sufficient (3) by two persons.

Four patients suffered from gingiva discomfort; in 2 cases a slight gingiva irritation and desiccation after the contact of bleaching gel with gingiva was observed. In other cases a gingiva pain after the removal of bleaching splint and during breakfast was noticed. One patient (28 years old) revealed nausea and stomach ache after two hours of gel application and vomits every other night. The interview exposed chronic ulcerous disease of stomach and duodenum. Other patients did not experience any discomfort dur-

Nr zęba	1+	2+	3+	4+	5+	+1	+2	+3	+4	+5	-1	-2	-3	-4	-5					
Średni kolor zęba przed wybieleniem Average tooth colour before bleaching	D3	A3	B4	D3	A3	D3	D3	A3,5	D3	D3	A3	A3	A3,5	A3,5	A3,5	A3	A3	A3,5	B4	B3
Średni kolor zęba po wybieleniu Average tooth colour after bleaching	D2	D2	D2	B2	B2	B2	B2	D2	B2	B2	A2	A2	C1	C1	C1	A2	A2	C1	C1	C1
Średnia różnica koloru zęba Average tooth colour change	7	5	9	7	6	7	7	8	7	7	4	4	6	6	6	4	5	6	6	6

nicach od 4 do 10 w 16 punktowej skali VITA, ze średnią 5,9 punktów. Zestawienie koloru poszczególnych zębów przed i po leczeniu przedstawiono w TABELI 3. Wynika z niej, że zęby szczęki uzyskały lepsze wyniki wybielenia

TABELA 3. Zestawienie koloru poszczególnych zębów przed i po leczeniu

TABLE 3. Comparison of each tooth's colour before and after treatment.

(średnio 7 punktów) niż zęby żuchwy (średnio o 5,3 punktów). Najlepiej wybieliły się górne kły, a najgorzej dolne zęby sieczne.

Pacjenci po zakończonym leczeniu oceniali również w punktach od 1 (niezadowolające) do 6 (znakomite) uzyskane wyniki wybielania zębów. Oceny dobre (4) i bardzo dobre (5) wystawiło jedenaście osób, a ocenę dostateczną (3) dwóch pacjentów. U 4 pacjentów podczas leczenia pojawił się dyskomfort ze strony dziąsła; w 2 przypadkach było to lekkie pieczenie i wysuszenie dziąsła po zetknięciu się z żelem wybielającym, a w pozostałych wystąpił ból dziąsła po zdjęciu nakładki i w trakcie spożywania śniadania. U jednej pacjentki (lat 28) codziennie w trakcie wybielania, pojawiały się po ok. 2 godzinach nudności, ból żołądka, a co drugą noc wymioty. Z wywiadu ustalono, że cierpiała ona na przewlekłą chorobę wrzodową żołądka i dwunastnicy. Pozostali pacjenci nie doznali żadnego dyskomfortu w trakcie wybielania.

Wrażliwość zębów w trakcie zabiegów wybielania wystąpiła u 9 pacjentów (69,2%). W czterech przypadkach była ona mocna, w czterech średnia, a w jednym słaba (TABELA 4). Dotyczyła reakcji na bodźce cieplne. Pojawiała się ok. 6-7 dnia wybielania po zdjęciu nakładki i dotyczyła głównie zębów siecznych. Większość pacjentów w czasie nasilenia objawów nadwrażliwości przerywała leczenie na jedną dobę. W celu zmniejszenia nadwrażliwości stosowano żele z hydroksyapatytem (Haxyl), fluorem (Elmex), płukanek fluorowych (Fluormex 0,02%, Meridol) oraz pasty do zębów (Elmex Sensitive, Sensodyne).

Wpływ wybielania na powierzchnię szkliva zębów zaobserwowało 6 osób. Według nich zęby stały się bardziej gładkie.

Ocenie ankietowej poddano również konsystencję i smak żelu oraz utrzymanie nakładki na zębach.

· Konsystencję żelu 10 pacjentów oceniło jako dobrą, 1 - za gęstą, 2 - za płynną.

· Smak preparatu 4 osoby określiły jako neutralny ("bez smaku"), 2 osoby - "smak wody utlenionej", reszta pacjentów - "przyjemny".

· Utrzymanie nakładki na zębach we wszystkich przypadkach uznano za dobre.

Pacjenci zwracali uwagę na trudność w dozowaniu prawidłowej ilości żelu do nakładki bez dodatkowego dozownika.

Wnioski

1. Domowe wybielanie preparatem Perox 10% charakteryzuje się dużą skutecznością.
2. Objawy nadwrażliwości zębów i nieznacznego stopnia podrażnienia błony śluzowej jamy ustnej, często towarzyszące wybielaniu, szybko ustępują, nie pozostawiając trwałych zmian.
3. Żel wybielający Perox 10% jest materiałem spełniającym oczekiwania pacjentów, co do komfortu przeprowadzania zabiegu wybielania.

Podziękowania

Badania finansowano z prac własnych Collegium Medicum UJ.

Odpowiedź Answer	Kobiety Female		Mężczyźni Male		Razem Total	
	n	%	n	%	n	%
Mocna Potent	3	37,5	1	20	4	30,8
Średnia Average	2	25	2	40	4	30,8
Słaba Slight	1	12,5	-	-	1	7,6
Brak/ None	2	25	2	40	4	30,8

TABELA 4. Wrażliwość zębów w trakcie i po zabiegu.

TABLE 4. Teeth hypersensitivity before and after treatment.

ing bleaching treatment.

Teeth hypersensitivity during treatment was observed in 9 patients (69,2%). In four cases it was strong, in four it was medium and in one case it was slight (TABLE 4). It was concerned with the reaction to thermal stimuli. It appeared on the 6-7th day of bleaching after the removal of bleaching splint and it concerned mainly the incisors. Most patients during the intensification of hypersensitivity sensations had discontinued treatment for one day. In order to lower the hypersensitivity hydroxyapatite gel (Haxyl), fluoride gel (Elmex), fluoride rinsings (Fluormex 0,02%, Meridol) and tooth pastes (Elmex Sensitive, Sensodyne) were used. The influence of bleaching on enamel surface was observed in 6 cases. According to the patients their teeth become smoother. The estimation by questionnaire was also performed as to the consistency and taste of gel as well as to the retention of the splint on teeth.

· The consistency was rated as good by 10 patients, too thick by 1 and too thin by 2.

· The taste of gel was rated as neutral (no flavor) by 4 persons, as having hydrogen peroxide flavor by 2 patients and as nice flavor by the rest of the group.

· The splint retention was rated as good in all cases.

Patients mentioned the difficulty of dosing the appropriate amount of gel to the splint without the use of an additional dose meter.

Conclusion

1. Nightguard bleaching performed at home with Perox 10% is considered to have high efficiency.
2. Teeth hypersensitivity and slight gingiva irritations, which often accompany the bleaching treatment, disappear fast without leaving any permanent lesions.
3. Perox 10% bleaching gel fulfils patients demands as to the comfort of the treatment

Acknowledgements

This study was supported from CM UJ.

- [1] Christensen G.J.: The tooth-whitening revolution. J.Am.Dent.Assoc. 133, 2002, 1277-1279.
- [2] Haywood V.B.: Commonly asked questions about nightguard vital bleaching. J.Am.Dent.Assoc., 128, 1997, Supl., 195-198.
- [3] Haywood V.B.: Historia, bezpieczeństwo i skuteczność współczesnych metod wybielania zębów. Zastosowanie metody nocnego wybielania żywych zębów z użyciem łyżki indywidualnej. Quintessence Int., 2, 1993, 1, 121-137.
- [4] Pawlaczek-Kamieńska T.: Zaburzenia barwy zębów pochodzenia wewnętrznego i zewnętrznego. Stom. Współcz., 1., 1998, 5, 16-20.

- [5] Chmielewski K.: Wybielanie zębów metodą nakładkową. Mag. Stomat., 5, 2000, 18-22.
- [6] Mokhlis G.R., Matis B.A., Cochran M.A., Eckert G.J.: A clinical evaluation of carbamide peroxide and hydrogen peroxide whitening agents during daytime use. J.Am.Dent.Assoc, 131, 2000, 1269-1277.
- [7] Duun J.R.: Dentist-prescribed home bleaching: current status. Compendium, 19, 1998, 8, 760-764.
- [8] Król K., Nowakowska-Socha J., Grocholewicz K.: Nocne nakładkowe wybielanie zębów żywych z zastosowaniem 10%-15% nadtlenu karbamidu. Przegląd piśmiennictwa. Porad. Stomat., 2, 2004, 8-32.
- [9] Leonard R.H., Haywood V.B., Philips C.: Risk factors for developing tooth sensitivity and gingival irritation associated with nightguard vital bleaching. Quintessence Int., 28(8), 1997, 527-534.

ZAGADNIENIE TRANSPORTU OBRAZU ELEKTROMAGNETYCZNYM SYGNAŁEM W OŚRODKU ELEKTRYCZNIE CZYNNYM

MARIUSZ WÓJCIK

KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI
AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA W KRAKOWIE

Streszczenie

W artykule przedstawiono pewne rozważania dotyczące transportu obrazu w za pomocą elektromagnetycznego sygnału rozwijającego się w ośrodku elektrycznie czynnym. Celem były teoretyczne rozważania pozwalające uwidocznienie związku pomiędzy impulsem elektromagnetycznym a wywołanym przez niego transportem jonów we włóknie nerwowym. Aparat matematyczny pozwolił na uzyskanie pewnych rozwiązań zgodnych z eksperymentalnym podejściem z znanym z literatury medycznej. Ten rodzaj analiz umożliwia głębsze wniknięcie w strukturę geometrii przepływu ładunków elektrycznych w włóknach przewodzących tak naturalnych jak i sztucznych kompozytach.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),209-212]

Wstęp

Komórka nerwowa, czyli neuron, jest podstawową jednostką morfologiczną i czynnościową układu nerwowego. Informacje przekazywane są zakodowane w postaci zmian potencjału błony, które przesuwały się na podobieństwo fali wzdłuż wypustek neuronu i są przenoszone przez synapsy na inne komórki nerwowe. W przekazie informacji zasadniczą rolę spełniają występujące w błonie komórki nerwowej kanały jonowe, przez które jony potasu i sodu, wapnia i chlorków oraz inne przepływają do i z komórki [1]. Autor w artykule "Modelowanie transportu obrazu modyfikowanym włóknem polimerowym" [2] przedstawił zagadnienie przeniesienia sygnału prądowego wywołanego transportem impulsu elektromagnetycznego.

Znalezione pole prądu Maxwella wynika z układu równań:

PROBLEM OF AN IMAGE TRANSPORTATION BY AN ELECTROMAGNETIC SIGNAL IN AN ELECTRICALLY ACTIVE OBJECT

MARIUSZ WÓJCIK

BIOMATERIALS DEPARTMENT,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS
UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, CRACOW

Abstract

Discussion on image transportation using electromagnetic signal developing in electrically active object was presented in paper. The theoretical considerations allowing revealing connections between an electromagnetic impulse and its effect on ions transport in the nerve fibres was the main aim. The mathematical modelling allows obtaining some solutions concordant with an experimental approach known from the medical literature. Such analysis give a possibility to penetrate into the geometry of the flow of electrical charges in a natural as well as an artificial conductive composites fibres.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),209-212]

Introduction

Neuron belongs to basic morphological and functional units in the nerve system. Transmitted information is codes in changing of the membrane cell potential that passes as wave along neuron endings and next are transported by synapses into others neurons. Ion channels at membrane cell play the main role during information transportation where potassium, sodium, calcium and chlorine ions flow into cell and back [1]. Author considered the problem of the transportation of the current signal that was caused by the electromagnetic impulse in the article "Modelling of Image Transportation Using Modified Polymers Fibres" [2].

The electromagnetic fields have been derived from the Maxwell equations:

$$\frac{\partial H}{\partial t} + \text{rot} E = 0, \quad \frac{\partial E}{\partial t} - \text{rot} H = j \quad (1)$$

where: $E, H, j: R^3 \times R^1 \rightarrow R^3$, are intensities of electric, magnetic and the current fields (FIG.1). For adequate assumptions

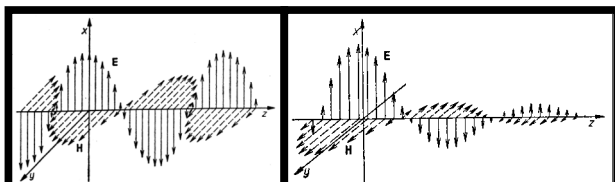
$$\frac{\partial H}{\partial t} + \text{rot} E = 0, \quad \frac{\partial E}{\partial t} - \text{rot} H = j \quad (1)$$

gdzie: $E, H, j: \mathbb{R}^3 \times \mathbb{R}^1 \rightarrow \mathbb{R}^3$, są natężeniami pól elektromagnetycznych i gęstości prądu.

Autor przy odpowiednich założeniach rozważa impuls postaci:

$$E_{x_i}(x) = f(x_k, x_l) + \sin(x_3 - t + \varphi_n) \quad H_{x_i}(x) = g(x_k, x_l) + \sin(x_3 - t + \psi_n)$$

gdzie funkcje f, g oznaczają rozmycie natężenia pola elektromagnetycznego w kierunkach ortogonalnych do rozchodzenia się impulsu pola.



RYS.1. Pola elektryczne i magnetyczne fali TEM rozchodzącej się w próżni (z prawej) i w ośrodku stratnym [].

FIG.1. Maxwell's fields of TEM (Transverse Electro-Magnetic) wave in a vacuum (left) and lose object (right) []

Modelowanie transportu obrazu

Spełnienie przez takie pola równań Maxwella prowadzi do kolejnych równań cząstkowych, hiperbolicznych, których rozwiązania mogą podać kształt pola prądu na ekranie odbiorczym, ortogonalnym do kierunku rozchodzenia się impulsu. Równania te mają postać:

$$-\Delta f + \frac{\partial}{\partial x_1} \left(\frac{\partial f}{\partial x_1} + \frac{\partial f}{\partial x_2} \right) = \frac{\partial j_1}{\partial t} \quad (2)$$

$$-\Delta f + \frac{\partial}{\partial x_2} \left(\frac{\partial f}{\partial x_1} + \frac{\partial f}{\partial x_2} \right) = \frac{\partial j_2}{\partial t} \quad (3)$$

Ponieważ funkcja f zależy jedynie od współrzędnych przestrzennych, zatem gęstości prądu mogą być jedynie funkcjami liniowymi czasu z wypisanymi współczynnikami. Ponieważ jednak gęstość prądu nie może silnie rosnąć czy maleć zatem odpowiednie współczynniki są zerami a stała addytywna jest jedynie funkcją zmiennych przestrzennych. Dostajemy zatem z (2,3):

$$(j_1, j_2) = (A_1(x), A_2(x)) \quad (4)$$

gdzie:

$$\Delta f - \frac{\partial}{\partial x_1} \left(\frac{\partial f}{\partial x_1} + \frac{\partial f}{\partial x_2} \right) = 0 \quad (5)$$

$$\Delta f - \frac{\partial}{\partial x_2} \left(\frac{\partial f}{\partial x_1} + \frac{\partial f}{\partial x_2} \right) = 0$$

Pozostałe związki posiadają postać:

$$\frac{\partial j_2}{\partial x_1} - \frac{\partial j_1}{\partial x_2} = \frac{\partial j_3}{\partial t} = 0 \quad (6)$$

oraz z powodu założonego identycznego rozmycia pól magnetycznych i elektrycznych w płaszczyźnie ortogonalnej do kierunku rozchodzenia się impulsu,

$$\Delta f = \frac{\partial j_3}{\partial x_2} - \frac{\partial j_2}{\partial x_3}, \quad \Delta f = \frac{\partial j_3}{\partial x_1} - \frac{\partial j_1}{\partial x_3} \quad (7)$$

Rozwiążemy obecnie równania (5). Dostaniemy:

$$\frac{\partial f}{\partial x_2} - \frac{\partial f}{\partial x_1} = B_1(x_1), \quad \frac{\partial f}{\partial x_1} - \frac{\partial f}{\partial x_2} = B_2(x_2) \quad (8)$$

A wobec tego otrzymamy ostatecznie:

$$\frac{\partial f}{\partial x_1} - \frac{\partial f}{\partial x_2} = B = \text{const.} \quad (9)$$

A zatem funkcja f musi posiadać określone własności, zależące od stałych:

the author considered the impulse of the form:

$$E_{x_i}(x) = f(x_k, x_l) + \sin(x_3 - t + \varphi_n) \quad H_{x_i}(x) = g(x_k, x_l) + \sin(x_3 - t + \psi_n)$$

where functions f, g denote adequate distributions of the electromagnetic fields on the orthogonal directions to the direction of the move of the impulse.

Main results

Fulfilling of the Maxwell's equations by the electromagnetic impulse lead to the another partial differential equations which can give us the formula of the current field on the receiver. Receiver is orthogonal to the direction of the move of the impulse. These equations have the form:

$$-\Delta f + \frac{\partial}{\partial x_1} \left(\frac{\partial f}{\partial x_1} + \frac{\partial f}{\partial x_2} \right) = \frac{\partial j_1}{\partial t} \quad (2)$$

$$-\Delta f + \frac{\partial}{\partial x_2} \left(\frac{\partial f}{\partial x_1} + \frac{\partial f}{\partial x_2} \right) = \frac{\partial j_2}{\partial t} \quad (3)$$

Function f depends on space variables only and the densities of the current j are linear function of time with adequate coefficients. We assume that adequate coefficients are equal zero and the additive constant are functions of the space variables because the current density can arise strongly as well as be lower. Hence we have from (2,3):

$$(j_1, j_2) = (A_1(x), A_2(x)) \quad (4)$$

where:

$$\Delta f - \frac{\partial}{\partial x_1} \left(\frac{\partial f}{\partial x_1} + \frac{\partial f}{\partial x_2} \right) = 0 \quad (5)$$

$$\Delta f - \frac{\partial}{\partial x_2} \left(\frac{\partial f}{\partial x_1} + \frac{\partial f}{\partial x_2} \right) = 0$$

Other equations have the form:

$$\frac{\partial j_2}{\partial x_1} - \frac{\partial j_1}{\partial x_2} = \frac{\partial j_3}{\partial t} = 0 \quad (6)$$

and because of an assumption about the identical dispersion of magnetic and electric fields of variables in the orthogonal plane to the direction of the movement of the electromagnetic impulse hence we have:

$$\Delta f = \frac{\partial j_3}{\partial x_2} - \frac{\partial j_2}{\partial x_3}, \quad \Delta f = \frac{\partial j_3}{\partial x_1} - \frac{\partial j_1}{\partial x_3} \quad (7)$$

We solve now the equation (5). We have:

$$\frac{\partial f}{\partial x_2} - \frac{\partial f}{\partial x_1} = B_1(x_1), \quad \frac{\partial f}{\partial x_1} - \frac{\partial f}{\partial x_2} = B_2(x_2) \quad (8)$$

and from this:

$$\frac{\partial f}{\partial x_1} - \frac{\partial f}{\partial x_2} = B = \text{const.} \quad (9)$$

Therefore the function f has adequate properties and it depends on the two constant:

$$\text{const} = x_1 + x_2, \quad \text{const} = f - Bx_1$$

Hence the solution function f has the form:

$$f(x_1, x_2) = \text{const} + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \Phi(x_1 + x_2), \quad \Phi$$

is an arbitrary function.

We write now the equality:

$$\frac{\partial A_1}{\partial x_2} = \frac{\partial A_2}{\partial x_1} \quad (10)$$

and:

$$A_3(x) = j_3 \quad (11)$$

(from the stationary of the component of the electrical current).

Because of assumed homogeneous of the object we can write: $A_1(x) = A_2(x) = A$ what gives us next equality:

From this we have:

$$j_i(x) = A(x_1 + x_2) + h_i(x_3), \quad i = 1, 2,$$

$$\text{const} = x_1 + x_2, \quad \text{const} = f - Bx_1$$

A wobec tego rozwiązaniem problemu będzie funkcja:

$$f(x_1, x_2) = \text{const} + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \Phi(x_1 + x_2), \quad \Phi$$

jest dowolną funkcją.

Zapiszmy jeszcze związki:

$$\frac{\partial A_1}{\partial x_2} = \frac{\partial A_2}{\partial x_1} \quad (10)$$

oraz, wobec stacjonarności prądu:

$$A_3(x) = j_3. \quad (11)$$

Z racji homogeniczności ośrodka musimy przyjąć

$A_1(x) = A_2(x) = A$, co tworzy kolejny związek:

$$\frac{\partial A}{\partial x_1} - \frac{\partial A}{\partial x_2} = 0 \quad (12)$$

skąd ostatecznie

$$j_i(x) = A(x_1 + x_2) + h_i(x_3), \quad i = 1, 2,$$

gdzie $A(x)$ jest dowolną funkcją.

Dostajemy po odjęciu stronami zależności (6)

$$\frac{\partial A_3}{\partial x_2} - \frac{\partial A_3}{\partial x_1} = 0,$$

skąd:

$$j_3(x) = \Psi(x_1 + x_2) + h(x_3), \quad \Psi$$

zależy od funkcji f ,

gdzie $h_3(x_3) = A \sin(\alpha x_3)$ spełnia równania (5,6).

$$\frac{\partial j_1}{\partial x_2} = \frac{\partial j_2}{\partial x_1}$$

Zauważmy, że równości spełniają funkcję

$$j_i(x) = h_i(x) + B_i(x_1, x_2), \quad i = 1, 2$$

Ponieważ założyliśmy równoprawność obu współrzędnych, zatem możemy składowe odpowiedniego prądu zapisać w postaci:

$$j(x) = h(x) + B(x_1, x_2)$$

co prowadzi do poprzednio uzasadnionej postaci:

$$j(x) = \text{const} + B(x_1 + x_2), \quad h = \text{const},$$

gdzie B dowolna funkcja.

Ostatnia zależność opisuje właśnie rozważaną w [1] pompę jonową, głównie jonów sodowych i potasowych prowadzących w przewodzie nerwowym impuls elektryczny do zespołu centralnego. Jonów na przemian dodatnich i ujemnych [4]. Przeanalizujmy pole prędkości tych jonów na podstawie równania ciągłości. Zauważmy, że zależność $h(x)$ nie została w pracy analizowana z powodu konieczności wypowiedzenia się o np. strątności przewodu, co nie jest zadaniem powyższej pracy. Natomiast funkcje te staną się ważne dla określenia pola prędkości elementu przesuwanego się pod wpływem prądu do ośrodka sterującego.

Wypiszmy równanie ciągłości:

$$\frac{\partial q}{\partial t} + \text{div}(qv) = 0 \quad \text{lub} \quad \frac{\partial q}{\partial t} + \text{div}(j) = 0 \quad (13)$$

Dlatego:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -\text{div}j, \quad j = qv$$

Ostatnie równanie pozwala wyliczyć pole gęstości ładunku jonów w transporcie impulsu do centralnego ośrodka kodującego. Równanie skalare wymaga dodatkowych warunków dla uzyskania wszystkich składowych wektora, a więc geometrycznych warunków dla transportu impulsu. Geometrycznymi warunkami dla takiego impulsu może być w przykład symetria względem pewnej helisy kołowej (RYS.2), jeśli przewód będzie miał symetrię radialną w przekrojach. Ponieważ wektor prądu j jest znany jako funkcja współrzędnych zatem ograniczone rozwiązanie $q(x, t)$ równania ciągłości musi mieć punkt osobliwy. Dlatego też funkcja $q(x, t)$ będzie miała charakterystyczną wibrację i relaksację w opi-

where $A(x)$ is an arbitrary function.

We subtract the equation (6):

$$\frac{\partial A_3}{\partial x_2} - \frac{\partial A_3}{\partial x_1} = 0,$$

and from this:

$$j_3(x) = \Psi(x_1 + x_2) + h(x_3), \quad \Psi \quad (12)$$

depends on the function f , where: $h_3(x_3) = A \sin(\alpha x_3)$ satisfies the equations (5,6).

$$\frac{\partial j_1}{\partial x_2} = \frac{\partial j_2}{\partial x_1}$$

Let's see that the equality satisfies the functions

$$j_i(x) = h_i(x) + B_i(x_1, x_2), \quad i = 1, 2,$$

Considering equal rights of the variables, hence we can write adequate components of the electrical current as:

$$j(x) = h(x) + B(x_1, x_2)$$

which leads to the form of the current:

$$j(x) = \text{const} + B(x_1 + x_2), \quad h = \text{const},$$

where B is arbitrary function.

The last formula describes the sodium and potassium potential of the ions both positive and negative alternatively (considered in [1]) which conduct the electric current impulse in the nerve fibre to the central body [4]. We will analyse the velocity field of these ions on the base of the continuity equation. We can see that we do not analyse the dependence $h(x)$ because we do not assume about e.g. loss of the electric conduit. These functions can be important for the description of the velocity of field element flowing under the current into the main steering base.

We consider now the continuity equation:

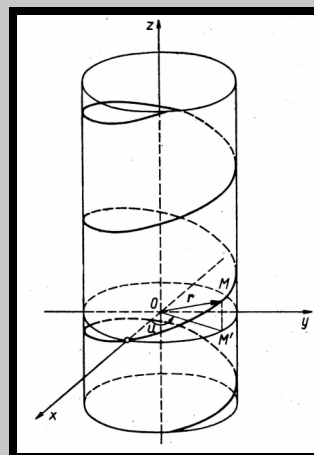
$$\frac{\partial q}{\partial t} + \text{div}(qv) = 0 \quad \text{or} \quad \frac{\partial q}{\partial t} + \text{div}(j) = 0 \quad (13)$$

Therefore:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = -\text{div}j, \quad j = qv$$

The last equation gives us the density of the ions in transport of the impulse to the receiving set centre. The equation requires additional conditions for finding all components of the vector. The symmetry of helices can be the geometrical conditions for the impulse transportation when fibres will have the radial section symmetry (FIG.2). Because j is known as a function of the variables therefore the bounded solutions q of the continuity equation have singular points. Therefore the function $q(x, t)$ will be the vibration (and a relaxation) in our process.

Considering the technical possibilities for manufacturing of symmetric polymer fibres composites modified with mag-



RYS. 2. Koncepcja trajektorii impulsu elektrycznego związanej z symetrią helisy kołowej.
FIG. 2. Conception of the electrical impulse trajectory according to circle helices.

sanym procesie transportu impulsu elektromagnetycznego. Mając na uwadze możliwości techniczne uzyskania kompozytowych włókien polimerowych modyfikowanych dodatkami o właściwościach magnetycznych o tejże symetrii możemy postawić zagadnienie przesyłu impulsu przez takie włókno. To zagadnienie będzie przedmiotem następnych rozważań.

Wnioski

1. Zmienny w czasie impuls elektromagnetyczny w efekcie dojścia do ekranu daje nam stacjonarny obraz źródła świecenia. Prąd w kierunku rozchodzenia się impulsu może słabnąć jeżeli wpływ ośrodka okaże się istotny i wówczas w praktycznych rachunkach założenie o homogeniczności ośrodka będzie musiało zostać przekonstruowane.
2. Prądy w kierunkach ortogonalnych również są stacjonarne i mogą wywoływać różnice potencjałów na ekranie, podkreślając własności punktów o maksymalnych natężeniach.
3. Funkcje rozmywające impuls punktowy mają określone ograniczenia, niemniej moc ich zbioru jest dostatecznie duża by przekazywać dobrze zarysowany sygnał wstępny. Dalsze rachunki wymagają już określonych własności technologicznych, dlatego nie będziemy uzyskanych związków rozbudowywać dalej. Wnioski te zależą już będą od ściśle zarysowanych warunków brzegowych oraz danych pomiarowych.

Piśmiennictwo

- [1] W.Z.Traczyk, Fizjologia człowieka, Wydawnictwa Lekarskie, 2004.
 [2] M.Wojcik, "Modelowanie transportu obrazu modyfikowanymi włóknami polimerowymi", Ogólnopolska Konferencja Naukowa - Modelowanie Cybernetyczne Systemów Biologicznych, Kraków, 2005.

netic additives we can consider the problem on impulse transportation through such fibres. This problem will be discussed in the next paper.

Conclusion

1. The amplitude of the electromagnetic impulse depends on the time and gives a stationary image of the electromagnetic source. The electrical current in the movement direction of electromagnetic impulse can be weakening for real conductor.
2. The currents for orthogonal direction are stationary too and they can cause the potentials difference on the receiving centre underlining properties of the points with maximal potentials.
3. The functions which weaken the impulse point have certain restrictions, however the initial power of the set impulse can be adequate strong to show good synopsis of the signal. Others calculations need technological materials parameters.

References

- [3] T.Morawski, W.Gwarek, Pola i fale elektromagnetyczne, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1998.
 [4] A.Longstaff, Instant Notes Neuroscience, PWN, 2002.

MIKROSTRUKTURA ORAZ NAPRĘŻENIA WŁASNE ODLEWANYCH STOMATOLOGICZ- NYCH STOPÓW Ni-Cr

ADAM BRZEZIAK*, STANISŁAW J. SKRZYPEK*,
JANUSZ JURASZEK**

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań biogodnych materiałów wykorzystywanych w protetyce dentystycznej. Badania wykonano na stopach Ni-Cr o nazwach handlowych Wiron, Remanium oraz Rodent. Przeprowadzono identyfikację składników mikrostruktury na zglądach metalograficznych, natomiast na powierzchni bocznej próbek wykonano analizę fazową oraz zmierzono powierzchniowy stan naprężeń własnych. W tym celu zastosowano mikroskopię świetlną, dyfrakcyjną analizę fazową oraz dyfrakcyjną metodę $\sin^2\psi$. Wykonano badania metalograficzne materiału. Ocena stanu naprężenia warstwy powierzchniowej, jak i analiza mikrostruktury stomatologicznych stopów Ni-Cr wykorzystane będą do doboru parametrów odlewania i do prognozowania właściwości złącza metal - powłoka ceramiczna.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),212-214]

Wstęp

Stopy Ni-Cr stanowią dużą grupę materiałów wykorzystywanych w protetyce dentystycznej na mostki, korony

MICROSTRUCTURE AND RESIDUAL STRESSES OF NICKEL-CHROMIUM DENTAL ALLOY CASTINGS

ADAM BRZEZIAK*, STANISŁAW J. SKRZYPEK*,
JANUSZ JURASZEK**

Abstract

The paper presents results of studies on biocompatible Ni-Cr high alloy materials used in prosthodontics. Investigations were carried out on Ni-Cr alloys manufactured under the trade names Wiron, Remanium and Rodent. Metallographic examinations were performed on alloy cross sections, while on the side surface of the specimens the phase analysis was made and the residual stresses was measured. These investigations were carried out by means of optical microscope equipped with digital camera, X-ray diffraction phase analysis and X-ray diffraction $\sin^2\psi$ method. Estimation of the superficial residual stresses state, as well as the analysis of microstructure of dental Ni-Cr alloys, will be used for fitting casting parameters and for modelling properties of ceramic to metal seals.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),212-214]

Introduction

Ni-Cr alloys constitute a large group of materials used in dental prosthetics for such applications as bridgeworks,

zębowe, wkładki zębowe, protezy [1]. Stopy te charakteryzują się dobrymi własnościami antykorozyjnymi oraz łatwością napalania ceramiki [2].

Metodyka badań

Materiał do badań stanowiły stopy Ni-Cr do uzupełnień protetycznych, o nazwach handlowych: Wiron 99, Rermanium CSe oraz Rodent. Skład chemiczny badanych materiałów przedstawiono w TABELI 1. Odlewanie przeprowadzono metodą traconego wosku. Odlane próbki miały kształt prostopadłościanów o wymiarach 10x20x1 mm. Powierzchnię boczną próbek odlewanych szlifowano, polerowano i poddano badaniom dyfrakcyjnym. Wykonano analizę fazową oraz zmierzono powierzchniowy stan naprężeń własnych (residual stress). Przeprowadzono również badania metalograficzne, z wykorzystaniem mikroskopu optycznego wyposażonego w kamerę cyfrową. Zgłady metalograficzne do badań mikroskopowych trawiono roztworem 1% kwasu HF.

Material Alloy	Ni	Cr	Mo	Si	Fe	Al	Ce	Nb	C	Co	B	Mn
Wiron 99	65	22.5	9.5	1	0.5	-	0.5	1	max 0.02	-	-	-
Rermanium CSe	61	26	11	1.5	< 1	< 1	< 1	-	-	< 1	-	-
Rodent	54.6	23.6	10.3	0.48	3.1	0.15	-	-	-	0.08	0.16	0.06

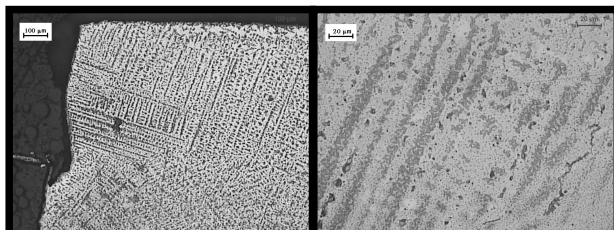
TABELA 1. Skład chemiczny badanych stomatologicznych stopów Ni-Cr [2, 3, 4].

TABLE 1. Chemical composition of the examined Ni-Cr dental alloys [2, 3, 4].

Wyniki

Mikrostrukturę ujawniono przez trawienie zgłód metalograficznych próbek roztworem kwasu fluorowodorowego. Badane stopy po odlewaniu wykazywały między sobą podobieństwo mikrostruktury [2] oraz charakteryzowały się dendrytyczną strukturą fazy Ni(Me). Najbardziej charakterystyczną strukturą dendrytyczną zauważyć można w przypadku stopu Wiron 99. Mikrostrukturę stopów po odlewaniu na przykładzie stopu Wiron 99 przedstawiono na zdjęciach (RYS.1).

Zapisy dyfraktometryczne po odlewaniu badanych materiałów przedstawiono na RYS.2. W badaniach dyfrakcyjnych zastosowano technikę krokowego zliczania impulsów przy kroku kątowym $\Delta 2\theta = 0,04^\circ$. Zapisy dyfraktometryczne wykonano celem analizy fazowej oraz pomiaru naprężeń własnych. W celu pomiaru naprężeń zastosowano metodę $\sin^2\psi$ [5] przy użyciu linii dyfrakcyjnej {311}, którą rejestrowano w zakresie kątowym 2θ 108-113°. Średnie odkształcenie sieci krystalicznej ϵ (fizyczną szerokość refleksu) obliczono wg wzoru (1), zaś energię zmagazynowaną w formie defektów sieciowych G ze wzoru (2) [6], a wyniki tych



RYS. 1. Mikrostruktura stomatologicznego stopu Wiron 99 po odlewaniu.

FIG. 1. Microstructure of Wiron 99 dental alloy after casting.

dental crowns, dentures and other steel prosthetics constructions. These alloys are characterized by good anticorrosive properties and by the ease of ceramic coating process.

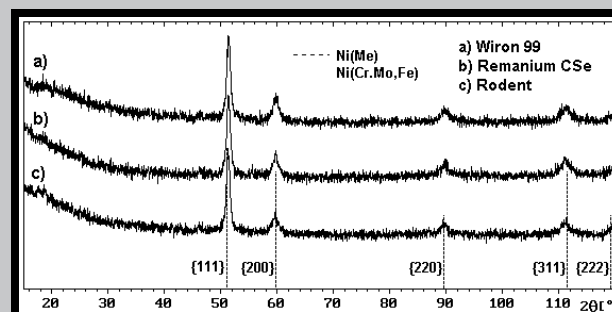
Examination method

Ni-Cr alloys applied in prosthodontics and manufactured under the trade names Wiron 99, Rermanium CSe, Rodent were used as a study materials. The chemical compositions of materials under investigation are presented in TABLE 1. Casts were made using the lost-wax process. The investigated samples took the shape of rectangular prisms with dimensions of 10x20x1 millimeters. The side surface of casted samples was ground, polished and subject to X-ray diffraction studies. The phase analysis was performed and the residual stresses were measured. The metallographic examinations on specimens were executed by means of optical microscope with digital camera. Specimens used in metallographic investigations were treated by 1% microetching HF solution.

Results

The microstructure was revealed by treating the specimens with the microetching HF solution. After casting the investigated alloys were similar with respect to structure [2] and were characterised by the dendritic structure of phase Ni(Me). The Wiron 99 alloy exhibits the most distinctive dendritic microstructure. The microstructure of casted alloys is presented in the pictures below (FIG.1), based on the example of Wiron 99 alloy.

Diffraction patterns after casting of investigation materials are presented in FIG.2. In X-ray diffractions the step count-



RYS. 2. Dyfraktogramy stomatologicznych stopów Ni-Cr (λ Co $K\alpha$).

FIG. 2. Diffraction patterns of Ni-Cr dental alloys (λ Co $K\alpha$).

Material	hkl	d_{hkl} [nm]	a_0 [nm]	θ [°]	β [°]	ϵ	G [MJ/m ²]
Wiron 99	311	0.10851	0.35989	55.59	0.93	0.00278	2.376
Rermanium CSe	311	0.10857	0.36009	55.55	0.85	0.00254	1.651
Rodent	311	0.10861	0.36022	55.52	0.84	0.00252	1.996

TABELA 2. Wyniki pomiarów subtelných cech struktury przy użyciu analizy profilu linii dyfrakcyjnej.

TABLE 2. Results of subtle structure features measurements using the diffraction line profile analysis.

obliczeń zestawiono w TABELI 2. Wyniki obliczeń makroskopowych naprężeń własnych dla $\nu=0,28$ zestawiono w TABELI 3.

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\bar{\beta}}{4 \tan \theta} \quad (1) \quad G = \frac{1}{2} \bar{\varepsilon}^2 E \quad (2)$$

gdzie: ε -śr. odkształcenie sieci, β -szerokość refleksu, G-energia zgmagazynowana, E-moduł Younga

Material	E [GPa]	σ_N [MPa]	$\sigma_{1,3}$ [MPa]
Wiron 99	205	-801 ^{±77}	-138
Remanium CSe	170	-799 ^{±84}	118
Rodent	170	-948 ^{±117}	-61

TABELA 3. Wyniki obliczeń odlewniczych makroskopowych naprężeń własnych ($\nu=0,28$).
TABLE 3. Results of casting residual stresses ($\nu=0,28$).

Wnioski

Mikrostruktury badanych stopów wykazują podobieństwo, z charakterystycznymi pasmami dendrytów fazy Ni(Me) o sieci A1 typu cF4.

Średnie odkształcenie sieci krystalicznej ε , jak i energia zgmagazynowana w formie defektów sieciowych G, badanych stopów po odlewaniu są największe w przypadku stopu Wiron 99, co łączy się z największą ilością defektów sieci krystalicznej. Największy parametr komórki elementarnej zmierzono w stopie Rodent, co wiąże się z największą ilością rozpuszczonych pierwiastków w sieci krystalicznej. Warstwa powierzchniowa odlewanych płytek znajduje się pod wpływem silnych ściskających makroskopowych naprężeń własnych pochodzących od skurczu odlewniczego.

Piśmiennictwo

- [1] Nałęcz M.: Biomateriały. Biocybernetyka i inżynieria biomedyczna 2000, tom 4, Warszawa 2003.
- [2] Richert M., Orlicki R.: Structure of metal to ceramic seals in porcelain coating alloys. *Biomaterials Engineering*, 38-43, (2004), pp. 114-117.
- [3] www.bego.com

ing pulse method was applied with the step size $\Delta 2\theta=0.04^\circ$. Diffraction patterns were recorded for the phase analysis and measurement of the residual stresses. In order to measure stresses using the diffraction line {311} recorded in range 2θ 108-113° the $\sin^2\psi$ method [5] was applied. The average strain of crystal lattice ε (physical reflex width) was calculated according to formula (1) and the stored energy in the form of lattice defect G according to formula (2) [6]. The obtained results are presented in TABLE 2. Results of macroscopic residual stresses for $\nu=0.28$ are given in TABLE 3.

$$\bar{\varepsilon} = \frac{\bar{\beta}}{4 \tan \theta} \quad (1) \quad G = \frac{1}{2} \bar{\varepsilon}^2 E \quad (2)$$

where: ε -average lattice strain, β -reflex width, G-stored energy, E - Young modulus

Conclusion

The microstructures of investigated Ni-Cr dental alloys show resemblance, having characteristic bands of dendrite's phase Ni(Me) with A1 lattice type cF4.

The values of the average strain of crystal lattice ε along with the stored energy in form of lattice defects G of the examined casted alloys are highest in the case of Wiron 99 alloy, which is due to the greatest number of crystal lattice defects. The highest parameter value of a unit cell was measured for the Rodent alloy, which is linked to the greatest number of dissolved elements in the crystal lattice. The superficial layer of casting plates is influenced by strong compression residual stresses resulting from casting contraction.

References

- [4] www.dentaurum.com
- [5] Skrzypek S.J.: New approach to measuring residual macro-stresses with the application of the grazing angle X-ray diffraction geometry. Kraków 2002 (in Polish).
- [6] Bojarski Z., Bold T.: *Prace Instytutu Hutnictwa* 22, 115 (1970).

RUSZTOWANIA DO HODOWLI TKANKOWYCH OTRZYMYWANE Z NANO- I MIKROCZĄSTEK POLIESTROWYCH

STANISŁAW SOSNOWSKI, STANISŁAW SŁOMKOWSKI

CENTRUM BADAŃ MOLEKULARNYCH I MAKROMOLEKULARNYCH PAN
UL. SIENKIEWICZA 112, 90-363 ŁÓDŹ
STASLOMK@BILBO.CBMM.LODZ.PL

[*Inżynieria Biomateriałów*, 47-53,(2005),214-216]

Na liście wymagań stawianych materiałom na rusztowania stosowane w inżynierii tkankowej znajdują się nie tylko biogodność i biodegradowalność tych materiałów do związków nieszkodliwych dla organizmu, lecz również odpowiednia morfologia umożliwiająca "wrastanie" zaszczepionych komórek, transport substancji odżywczych do i usuwanie niepożądanych metabolitów z wnętrza rusztowań oraz niezbędne właściwości mechaniczne. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia o wytwarzaniu polimerowych rusztowań

SCAFFOLDS FOR CELL CULTURES PRODUCED FROM NANO- AND MICROPARTICLES

STANISŁAW SOSNOWSKI, STANISŁAW SŁOMKOWSKI

CENTER OF MOLECULAR AND MACROMOLECULAR STUDIES, POLISH ACADEMY OF SCIENCES, SIENKIEWICZA 112, 90-363 LODZ
STASLOMK@BILBO.CBMM.LODZ.PL

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),214-216]

List of requirements concerning materials for scaffolds for tissue engineering includes not only their biocompatibility, biodegradability to not harmful degradation products but also proper morphology allowing in-growth of inoculated cells, transport of nutrients in and removal of unwanted metabolites as well as appropriate mechanical properties. Recently, there were reports on fabrication of polymeric scaffolds by sintering poly(L,L-lactide-co-glycolide) microspheres [1,2]. The obtained materials were amorphous

wań na drodze zgrzewania mikrosfer poli(L,L-laktyd-co-glikolid) [1,2]. Otrzymywane materiały były amorficzne i zawierały wyłącznie pory o wymiarach zbliżonych do wymiarów komórek kościotwórczych - osteoblastów. W tej pracy omówimy nowy sposób wytwarzania rusztowań polegający na zgrzewaniu mieszaniny mikrosfer poli(L,L-laktyd-co-glikolid), mikrocząstek poli(L,L-laktydowych) o nieregularnych kształtach oraz kryształków NaCl a następnie na wymywaniu cząstek soli. Zamiarem naszym jest określenie zależności między właściwościami mechanicznymi oraz porowatością rusztowań (w tym rozkładem wielkości porów) a składem mieszaniny stosowanej do wytwarzania rusztowań.

Otrzymywanie mikrocząstek - elementów rusztowań

Poli(L,L-laktyd) (PLLA) otrzymano na drodze pseudoanionowej polimerizacji L,L-laktydu (Boehringer-Ingelheim) inicjowanej dietyloetoksyglinem, prowadzonej w suchym 1,4-dioksanie. Syntetyzowany polimer wytrącano do zimnego metanolu i suszono w próżni. Surowy polimer rozpuszczano w chlorku metylenu. Zanieczyszczenia związkami glinu wprowadzanymi podczas inicjowania usuwano wytrącając roztwór polimeru z 0,1 N HCl. Następnie roztwór polimeru zobojętniano przemywając do 0,1 N roztworem NaHCO_3 . W kolejnym etapie przemywano go kilkakrotnie wodą destylowaną. W końcu polimer dwukrotnie wytrącano do zimnego metanolu i suszono w próżni. Otrzymano polimer o $M_n=27000$ i $M_w/M_n=1,42$.

Poli(L,L-laktyd-co-glikolid) (PLGA) (Resomer 504H z firmy Boehringer-Ingelheim, Niemcy) oraz chlorek sodu (cz.d.a., POCh, Polska - frakcja o wielkości cząstek w zakresie od 50 do 400 μm) stosowano bez dalszego oczyszczania.

Mikrocząstki PLLA otrzymywano na drodze dializy 2,5 % (w/o) roztworu poli(L,L-laktydu) w acetonitrylu prowadzonej wobec wody. Do dializy użyto membrany SERVA Spectra/Por® 6, MWCO 1000, w formie rur o średnicy $d=11,5$ mm. Otrzymywane cząstki o wysokim stopniu krystaliczności składały się z agregatów częściowo rozwarstwionych lameli. Cząstki miały nieregularne kształty. Ich typowe wymiary wynosiły około 50 μm .

Mikrosfery PLGA otrzymywano na drodze dializy w ten sam sposób jak cząstki PLLA. Liczbowo średnia średnica otrzymywanych cząstek (D_n) wynosiła 420 nm a współczynnik polidispersji średnic (D_w/D_n) był równy 2,5.

Wytwarzanie rusztowań poliestrowych

Rusztowania będące porowatymi cylindrami o średnicy 6 mm i wysokości 3 mm otrzymywano metodą zgrzewania składników i wymywania NaCl. Odpowiednie ilości PLLA, PLGA i NaCl mieszano stosując wytrząsarkę oscylacyjną. Następnie mieszaninę umieszczano w formie nadającej próbkę kształt cylindra i poddawano prasowaniu w temperaturze 70°C pod ciśnieniem 10 MPa przez czas od 6 do 24 godzin. Następnie próbki umieszczano w dużej ilości destylowanej wody i wymywano z nich NaCl. Wodę zmieniano po 2, 4, 8, 24 i 32 godzinach. Otrzymywane rusztowania suszono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny na powietrzu, a następnie przez 8 godzin pod próżnią.

Niektóre właściwości rusztowań

Całkowitą porowatość rusztowań oszacowano biorąc pod uwagę oznaczone wymiary próbek, wagę przed i po wymywaniu NaCl, oraz gęstości materiałów stosowanych do ich wytwarzania. Przyjęto, że gęstość polimerów wynosi 1,24 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a gęstość NaCl 2,17 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. W przypadku rusz-

and contained predominantly pores suitable for accommodation of isolated cells (size of the pores was similar to dimensions of bone-producing cells - osteoblasts). In this paper we report on fabrication of polymeric scaffolds by a new method that consists on sintering a mixture of poly(L,L-lactide-co-glycolide) microspheres, poly(L,L-lactide) microparticles with irregular shape, and NaCl particles followed by salt leaching. We wanted also to establish the dependence of mechanical properties and porosity (pore distribution) on composition of the mixture used for scaffolds preparation.

Formation of particles - building blocks for making scaffolds

Synthesis of poly(L,L-lactide) (PLLA) was carried on in dry 1,4-dioxane by pseudo-anionic polymerization of L,L-lactide (Boehringer-Ingelheim) initiated with diethylethoxyaluminum. Synthesized polymer was precipitated into cold methanol and dried in vacuum. Crude polymer was dissolved in methylene chloride. Aluminum derivatives introduced during initiation were removed by shaking the solution with 0.1 N HCl. Thereafter, the polymer solution was neutralized by shaking with 0.1 N solution of NaHCO_3 . Then, the poly(L,L-lactide) solution was washed several times with distilled water. Eventually, the polymer was purified by twice repeated precipitation into cold methanol and dried under vacuum. Synthesis yielded poly(L,L-lactide) with $M_n=27000$ and $M_w/M_n=1.42$.

Poly(L-lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) (Resomer 504H supplied by Boehringer-Ingelheim, Germany) and sodium chloride (analytical grade, POCh, Poland - fraction with size from 50 to 400 μm) were used as received.

PLLA particles were obtained by dialysis of 2.5% (w/v) solution of poly(L,L-lactide) in acetonitrile against distilled water. SERVA Spectra/Por® 6 dialysis tubing, MWCO 1000, $d=11.5$ mm was used as dialysis bag. The obtained highly crystalline particles were composed of aggregates of partially exfoliated lamellae. Their shapes were irregular and typical dimensions were from a few to ca 50 μm .

PLGA microspheres were obtained by dialysis in the same way as PLLA particles. Obtained microspheres had number average diameter (D_n) and diameter polydispersity factor (D_w/D_n) equal 420 nm and 2.5, respectively.

Formation of polyester scaffolds

Scaffolds with shape of porous cylinders with diameter 6 mm and 3 mm height were obtained by particle sintering - salt leaching technique. Required amounts of PLLA, PLGA and NaCl were mixed using an oscillating shaker. Samples of the mixture were placed in a mould with cylindrical cavity and pressed at 70°C under pressure equal 10 MPa for the required time (from 6 to 24 hours). Thereafter, the scaffolds were placed in a large amount of distilled water with purpose to wash out NaCl. Water was changed after 2, 4, 8, 24, 32 hours. Obtained scaffolds were dried for 24 hours in air and for 8 hours under vacuum at room temperature.

Selected properties of the scaffolds

Total porosity of the scaffolds was estimated taking for calculations measured geometrical dimensions and weight of samples before and after NaCl leaching. For of polymers the value 1.24 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ was taken. Density of NaCl equals 2.17 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. For scaffolds with initial NaCl weight fraction equal 80.3% the measured total porosity was equal 74%. It has to be noted that porosity due to very large pores formed



ALLOPLASTYCZNA PROTEZA WYROSTKA KŁYKCIOWEGO ŻUCHWY W LECZENIU ANKYLOZY STAWÓW SKRONIOWO-ŻUCHWOWYCH - OPIS PRZYPADKU

CIEŚLIK T., ADWENT M., CIEŚLIK-BIELECKA A.

I KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ ŚAM
ZABRZE

[*Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),217-218*]

Wstęp

Ankyloza stawów skroniowo-żuchwowych (SSŻ) jest przewlekłym schorzeniem, w przebiegu którego dochodzi do zrostu kostnego między wyrostkiem kłykciowym żuchwy a panewką stawową kości skroniowej [4]. Choroba ta występuje w wyniku przebytych urazów okolicy stawów skroniowo-żuchwowych lub w wyniku toczących się w stawach patologicznych procesów zapalnych. Może wystąpić u dzieci jak i osób dorosłych. Szczególnie w pierwszym przypadku ma dramatyczny przebieg ze względu na zahamowanie rozwoju żuchwy, czego wynikiem są deformacje twarzy i zaburzenia podstawowych funkcji fizjologicznych takich jak oddychanie czy połykanie. Ankylozę SSŻ leczy się chirurgicznie i jest to metoda z wyboru [3]. Techniki operacyjne są zróżnicowane. Począwszy od przecięcia zrostu kostnego i przeszczepienia między odcięte fragmenty chrząstki lub powięzi, do całkowitego zastąpienia stawu przez protezę [3]. Protezy stawów mogą być jednoczęściowe lub dwuczęściowe. Protezy jednoczęściowe zastępują wyrostek kłykciowy lub panewkę stawową, protezy dwuczęściowe składają się z obydwu tych elementów [5]. Zastosowana w naszym przypadku proteza wyrostka kłykciowego żuchwy posiadała powierzchnię stawową zbliżoną do powierzchni anatomicznej wyrostka kłykciowego żuchwy osoby dorosłej.

Cel pracy

Celem pracy była ocena leczenia ankylozy stawów skroniowo-żuchwowych z zastosowaniem protezy wyrostka kłykciowego.

Materiał i metody

W I Katedrze i Klinice Chirurgii Szczękowo-Twarzowej w Zabrze leczono 64 letnią pacjentkę z powodu ankylozy stawu skroniowo-żuchwowego po stronie lewej. Pacjentka ta zgłosiła się do leczenia z powodu znacznego ograniczenia odwodzenia żuchwy, co utrudniało mowę i przyjmowanie posiłków. Nie poruszała się o własnych siłach. Od 25 lat chorowała z powodu przewlekłego uogólnionego gośćca stawowego powodującego zniekształcenie stawów kończyn dolnych i górnych. Badaniem klinicznym stwierdzono znaczne unieruchomienie żuchwy. Odwodzenie żuchwy ograniczało się do 0,8 mm, a ruchy boczne i wysuwania były całkowicie nieobecne. Badanie radiologiczne rtg pantomograficzne i TK stawów skroniowo-żuchwowych wykazały zacienienie w okolicy lewego stawu skroniowo-żuchwowego, lite, z całkowitym zamknięciem szpary stawowej, co mogło świadczyć o obecności monobloku kostnego w okolicy lewego stawu skroniowo-żuchwowego. Obraz kliniczny i radiologiczny przemawiał za ankylozą lewego stawu skroniowo-żuchwowego.

ALLOPLASTIC PROSTHESIS OF MANDIBLE CONDYLE IN TREATMENT OF TEMPOROMANDIBULAR JOINT ANKYLOSIS

217
.....

CIEŚLIK T., ADWENT M., CIEŚLIK-BIELECKA A.

I DEPARTMENT AND CLINIC OF ORAL AND MAXILLOFACIAL
SURGERY OF SILESIA MEDICAL ACADEMY, ZABRZE

[*Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),217-218*]

Introduction

The term temporomandibular joint ankylose (TMJ) refers to the bone or fibrous adhesion of anatomic joint structures [4]. Trauma or chronic infections are the main causes of ankylosis. It can occurs in children and adults. Early TMJ ankylosis in children determent mandibule growth resulting in facial deformity and physiological dysfunctions. Treatment method of choice is the surgery [3]. The treatment requires removal of sufficient amount of bone to allow for free movements with grafting the fascia or cartilage between the bone structures to prevent reankylosis. Or in severe cases complete TMJ replace with prosthesis is necessary [3]. TMJ prostheses replace glenoid fosse, condyle or complete joint [5]. In our case of TMJ ankylosis we used mandible condyle prosthesis with the anatomic like condyle shape.

Aim of the study

The aim of the study was the evaluation of treatment of TMJ ankylosis with replacing the joint with condyle prosthesis.

Material and method

A 64 years old woman was treated in the I Department of Maxillofacial Surgery in Zabrze. Because of limited mouth opening she had a problems with eating and talking. She had a chronic autoimmuneological panarthritis from 25 years. The changes in the joints were so advanced that she could not walk and required constant nursing help. Physical examination reveled limited mandible motion and mouth opening 0,8 mm. Radiological examination and CT scanning reveled left TMJ ankylosis. The patient was qualified to the surgery to replace the left mandible condyle with prosthesis. After performing retromandibular incision and tissue dissection left ankylotic TMJ was exposed. Mandible movements despite of muscles relaxation was only 0,8 mm. The mandible condyle was cut off and removed with the ankylotic bone block. Glenoid fosse was reshaped. The condyle prosthesis was placed in the fosse and fix to the mandible ramus with the screws. The passive mandible movements were 30 mm. After the surgery occlusal splints were prepared to keep the proper occlusion and to performed active and passive functional therapy. 1 month after surgery mouth opening was 2,1 mm and according to patient relation was increasing. The pain of TMJ was not present.

Results and discussion

Surgery of TMJ ankylosis is the method of choice. Decision of using autogenous material or alloplastic material depends of ankylosis etiology. Traumatic changes can be

wo-żuchwowego. Pacjentka została zakwalifikowana do leczenia operacyjnego. Wykonano zabieg operacyjny. Z cięcia okalającego kąt żuchwy dotarto do okolicy lewego SSŻ. Stwierdzono obecność litego bloku kostnego hamującego ruchy żuchwy. Odwodzenie pomimo zwiotczenia mięśni nadal wynosiło 0,8 mm. Odcięto wyrostek kłykciowy żuchwy u podstawy szyjki i wypreparowano usuwając go wraz z blokiem kostnym. Następnie wygładzono powierzchnię stawową kości skroniowej usuwając e wyrosła kostne, formując nową panewkę. W tak przygotowane łóżko kostne wprowadzono protezę wyrostka kłykciowego i ustabilizowano ją do gałęzi żuchwy za pomocą tytanowych śrub. Po stabilnym zespoleniu protezy stawowej z gałęzią żuchwy odwodzenie wynosiło 30 mm. Ranę po wyprowadzeniu na zewnątrz drenażu ssącego szczelnie zamknięto. Po zabiegu pobrano wyciski i wykonano płyty zgryzowe dla ustawienia prawidłowego zwarcia łuków zębowych. Zastosowano aktywną mechanoterapię celem ćwiczenia odwodzenia żuchwy. Podczas kontroli 1 miesiąc po zabiegu odwodzenie żuchwy wynosiło 2,1 mm i według relacji pacjentki sukcesywnie się zwiększa. Nie podawała dolegliwości bólowych w stawach skroniowo-żuchwowych.

Omówienie wyników i dyskusja

Chirurgiczne leczenie ankylozy stawów skroniowo-żuchwowych jest metodą z wyboru. Zastosowanie materiału autogenego lub allogennego zależy od etiologii powstania ankylozy. W przypadku pourazowych zrostów kostnych stawów skroniowo-żuchwowych można zastosować przeszczepy powięziowe, chrzęstne lub chrzęstno-kostne, oczekując dobrych wyników leczenia [1,2]. W przypadku wystąpienia zmian pozapalnych zastosowanie materiału własnego pacjenta jest ryzykowne ze względu na duże prawdopodobieństwo nawrotu choroby. Zastąpienie skostniałego stawu protezą jest metodą leczenia, która zapewnia długotrwały efekt terapeutyczny. Użycie przez nas protezy wyrostka kłykciowego pozwoliło na osiągnięcie odwodzenia żuchwy do 2,1 mm, już 1 miesiąc po zabiegu, podczas gdy przez 2 lata nie było większe niż 0,8 mm. Niektórzy autorzy uważają, że zastosowanie wyłącznie protezy wyrostka kłykciowego, bez sztucznej panewki może powodować złamanie lub perforację kości skroniowej [5]. Wydaje się jednak, że w analizowanym przez nas przypadku takie zagrożenie nie występuje. Ankyloza stawu spowodowała, że okolica panewki stawowej była zbudowana z twardej zbitą kością, a kształt głowy protezy wyrostka kłykciowego, którą zastosowaliśmy, zapewniał dużą powierzchnię kontaktu z kością. Ze wstępnych obserwacji leczenia można wysunąć wniosek, że proteza wyrostka kłykciowego może być z powodzeniem zastosowana w skrajnych przypadkach ankylozy stawów skroniowo-żuchwowych.

treated with autogenous fascia, chondral or costo-chondral grafts [1,2]. In case of ankylotic changes after infections reankylosis after autogenous graft is probable. Replacement of the joint with prosthesis provide long term treatment results. In our case after condylectomy and placement of the condyle prosthesis mouth opening was 2,1 mm. According to some authors using of condyle prosthesis alone may cause fracture of article fosse [5]. In our case there was no such a thread. TMJ ankylosis caused that article fosse was build of strong dense bone and the head of condyle prosthesis that we used provide large surface of contact with the bone. The short term observation confirmed good treatment results of TMJ ankylosis with alloplastic condyle prosthesis.

Piśmiennictwo

References

- [1] Karasu H., Okeu K., Ortakoglu K., Bayar G.: Treatment of temporomandibular joint ankylosis with temporalis superficial fascia flap. *Military Medicine* 2005;170:2; 167-171.
- [2] Rishiraj B.: Treatment of temporomandibular joint ankylosis: a case report, 2001;67:11, 659-663.
- [3] Su-Gwan K.: Treatment of temporomandibular joint ankylosis with temporalis muscle and fascia flap. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2001; 30: 189-193
- [4] Valentini V., Vetrano S., Agrillo A., Torroni A., Fabiani F., Lanetti G.: Surgical treatment of TMJ ankylosis. *J. Craniofac. Surg.* 2002; 13: 59-62
- [5] Van Loon J., De Bond L., Boering G.: Evaluation of temporomandibular joint prostheses: review of literature from 1946-1994 and implication for further prosthesis designs. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 1995; 9:53, 984-996.

OCENA KOPOLIMERU PGLA WSZCZEPIONEGO W ŻUCHWĘ I TKANKI MIĘKKIE KRÓLIKÓW - OBSERWACJE PÓŁROCZNE

ADWENT M.*, CIEŚLIK M**, CIEŚLIK-BIELECKA A.*, SABAT D.***, DUDA M.*, CIEŚLIK T*.

*I KATEDRA I KLINIKA CHIRURGII SZCZĘKOWO-TWARZOWEJ ŚAM, ZABRZE

**KATEDRA I ZAKŁAD MATERIAŁOZNAWSTWA STOMATOLOGICZNEGO ŚAM, BYTOM

***KATEDRA I ZAKŁAD PATOMORFOLOGII ŚAM, ZABRZE

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),219-221]

Wstęp

Kopolimery laktydu i glikolidu obecne są w medycynie od lat sześćdziesiątych XX wieku. Wytwarzano z nich między innymi nici chirurgiczne. Znalazły również znalazły w chirurgii szczękowo-twarzowej jako elementy stabilizujące złamania kości twarzoczaszki. Szczególnie chętnie wykorzystywane są przez chirurgów w leczeniu złamań i wad rozwojowych u dzieci. Właściwości termoplastyczne kopolimerów PGLA umożliwiają ich dowolne formowanie, co pozwala na dostosowanie kształtu elementów zespalających do panujących warunków anatomicznych [4]. Stopniowa resorpcja polimerów z równoczesnym zastępowaniem wszczepu tkanką kostną wyklucza konieczność ponownego zabiegu operacyjnego związanego z ich usunięciem. Elementy zespalające wykonane z metalu są częściej stosowane, jednak mogą wywołać szereg niekorzystnych reakcji związanych z ich korozją, aktywnością elektryczną i magnetyczną a także różnicą parametrów mechanicznych między kością a metalem [5], co sprawia że wielu autorów zaleca ich usunięcie po uzyskaniu zrostu kostnego [1,3]. Wiąże się to z koniecznością przeprowadzenia kolejnego zabiegu operacyjnego. Polimery w chirurgii szczękowo-twarzowej stosowane są także jako szkielet do odbudowy nowej tkanki kostnej w przypadkach, w których ważne jest zachowanie kształtu i wysokości odbudowywanej kości. Aby jednak ta funkcja mogła być właściwie zrealizowana konieczna jest ścisła kontrola czasu resorpcji oraz dostosowanie tego czasu do szybkości tworzenia nowej tkanki. Dlatego prowadzone są badania mające na celu uzyskanie materiału o dużej biogodności, dobrych właściwościach mechanicznych, który ulegałby biodegradacji [2,6]. Materiałami spełniającymi powyższe wymagania są polimery kwasu mlekowego.

Materiał i metody

Wykonano badania doświadczalne czystego kopolimeru laktydu i glikolidu PGLA na 30 królikach nowozelandzkich, za zgodą Komisji Bioetycznej przy Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Zwierzęta operowano i przechowywano w Centralnej Zwierzętarni Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Po znieczuleniu nacinano skórę w okolicy podżuchwowej po stronie lewej i docierano do trzonu żuchwy. Wiertłem o średnicy 2,9 mm wykonywano kanał na dolnej krawędzi trzonu żuchwy poniżej zęba siecznego. W tak przygotowane łożo wprowadzano badany wszczep z kopolimeru laktydu i glikolidu, w kształcie walca o średnicy 3 mm. Rany zaszywano. Następnie z cięcia skór-

EVALUATION OF PGLA COPOLYMER IMPLANTED IN THE MANDIBLE AND SOFT TISSUE OF THE RABBIT- 24 MONTHS OBSERVATION

ADWENT M.*, CIEŚLIK M**, CIEŚLIK-BIELECKA A.*, SABAT D.***, DUDA M.*, CIEŚLIK T*.

*I DEPARTMENT AND CLINIC OF ORAL AND MAXILLOFACIAL SURGERY OF SILESIAN MEDICAL ACADEMY, ZABRZE

**DEPARTMENT & SECTION OF STOMATOLOGICAL MATERIALS SCIENCE OF SILESIAN MEDICAL ACADEMY, BYTOM

***DEPARTMENT OF PATHOMORFOLOGY OF SILESIAN MEDICAL ACADEMY, ZABRZE

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),219-221]

Introduction

Lacide and glycolide polymers were used in medicine from the sixties of XX century as a material for surgery suture. Biocompatibility of polymers as well as gradual resorption increased its value. Within the time polymers were used as a fixation elements in bone fractures in maxillofacial surgery. Especially in bone surgery in children. Thermoplastic properties of polymers allows to form its shape to the bone curves [4]. Gradual resorption with simultaneous bone ingrowth eliminate necessity of another surgery for plate and screws removal. The metallic fixation elements are more popular however may cause a lot of unneeded reactions compared with corrosion, electrical and magnetic activity, and difference with bone and metal elasticity [5]. That's why some authors advice to remove fixation elements after bone healing [1,3]. This require another surgery. PGLA polymers are also used in bone regeneration, where it is important to preserved initial bone volume and high. To achieve this process exact control of the time of polymer resorption and its synchronisation with new bone ingrowth is necessary. That's why experimental studies are being performed to achieve resorbable material of good mechanical properties [2].

Material and methods

The experimental study was performed on 30 New Zealand white rabbits of both sex with weight between 3500-4000 g. All animals received atropine and xylazine premedication, and then were anaesthetized with ketamine. Additionally tissues surrounding the operation area were injected with lidocaine. In the first stage of surgery after incision over the left mandible corpus, inferior ridge of mandible was exposed. The canal in the bone was made with 3,2 mm diameter bur. The size of PGLA+CF implants was 3,2 mm in diameter, high corresponding with the depth of the prepared canal. Implants were placed into the prepared canals. The wound were then sutured. Additionaly implants were placed in the muscles and subcutaneous tissue of the back. The animals were divided into 7 groups: 4 animals, 2 males and 2 females. The control periods were marked after 1,2,3,6,12,24. Radiological and pathological study were performed. Kidneys and leaver were also examined.

219
.....

nego na grzbiecie preparując tkanki docierano do mięśnia prostego grzbietu, w którym po wytworzeniu kieszeni umieszczano fragment badanego wszczepu. Podobnie wszczep umieszczano w kieszeni wytworzonej w tkance podskórnej. Rany szczelnie zaszywano. U wszystkich zwierząt wykonywano obserwacje kliniczne przebiegu gojenia ran. W ocenie klinicznej uwzględniono zachowanie zwierząt oraz gojenie ran. Po likwidacji zwierząt w 7, 14 i 21 dobie, oraz w 6, 12 i 24 tygodniu doświadczenia oceniano makroskopowo wygląd ubytków i tkanek kostnych bezpośrednio je pokrywających. Wykonywano badania radiologiczne na podstawie rentgenowskich zdjęć zębowych obejmujących część trzonu żuchwy wraz z zębami i ubytkami kostnymi. W badaniach histopatologicznych oceniano tkankę kostną w miejscu wykonywanych ubytków i z otoczenia, ponadto tkankę podskórną i mięśniową z okolic kręgośłupa lędźwiowego. Badano również wątrobę i nerki.

Obserwacje kliniczne

W okresie pooperacyjnym zwierzęta zachowywały się spokojnie. Okres całkowitego wygojenia się ran wynosił 10 - 14 dni. Przez cały okres doświadczenia obserwowano stały przyrost masy ciała królików.

Badania radiologiczne

W 7 dobie widoczne było kuliste przejaśnienie o regularnych brzegach, wielkością odpowiadające wykonanemu ubytkowi tkanki kostnej. W późniejszym okresie obserwowano zmniejszające się już nieregularne przejaśnienie, które w grupie badanej było widoczne w postaci drobnych punkcików, przeważały jednak wyspowate cienie. W 24 tygodniu ubytek kostny wypełniony był już zmineralizowaną tkanką, co widoczne było w postaci zaznaczonego zaciemnienia [RYS.1].

Badania histopatologiczne

W tkance kostnej do 14 doby obserwacji widoczny był wyraźnie uformowany ubytek pokryty przez młodą tkankę łączną włóknistą z cechami aktywnej odbudowy kości pod postacią licznych pasm młodych, niedojrzałych beleczek obrzeżonych osteoblastami. Ponadto obecne były martwice resztki tkanki kostnej otoczone osteoklastami. W tkance łącznej włóknistej uwidoczniły się włókna kolagenowe oraz niedojrzałe i dojrzałe beleczki kostne pokryte osteoblastami. W 3 i 6 tygodniu kanał wszczepu pokryty był kością. W głębszych warstwach beleczki wykazywały cechy aktywność osteoblastycznej. Po 12 tygodniach ściana kanału była wyraźnie ukształtowana, pokryta dojrzałą tkanką kostną. Obserwacja w okresie 24 tygodni wykazała przerośnięcie kanału wszczepu przez tkankę łączną włóknistą tworzącą obraz sitowaty. Pomiędzy jej pasmami znajdowały się fragmenty kopolimeru. Obecne były komórki olbrzymie typu "około ciała obcego" i towarzyszący im skąpy wysięk zapalny. Miejscowo pojawiały się cechy osteogenezy z tworzeniem młodej kostniny.

W tkance podskórnej po tygodniu obserwacji wszczep otoczony był cienką torebką łącznotkankową. W 3 i 6 tygodniu obserwowano pogrubienie torebki z obecnością włókien kolagenowych. U niektórych zwierząt torebka była cienka i pokrywała wszczep. Nie obserwowano wysięku zapalnego. Podobny obraz był widoczny po 12 tygodniach. W 24 tygodniu ze ścian torebki do światła wytworzonej torbieli wrastały cienkie i grube włókna tkanki łącznej, tworzące sito, z obecnością licznych fragmentów kopolimeru. W rozrastającej się tkance widoczny był ogniskowo wysięk zapalny [RYS.2].

Początkowa obserwacja tkanki mięśniowej wokół wszcze-

Clinical evaluation

In the postoperative period animals were steady, all wounds were healed before 10-14 days. Animals successively increased its weight.

Radiological evaluation

After 7 days bone defect corresponded with implant size. Within the time the defect was getting irregular with signs of mineralization and after 24 weeks it was filled with mineralized tissue what was visible as a circle-like shadow [FIG.1].



RYS. 1. Radiogram boczny żuchwy, 24 tydzień.
FIG. 1. Lateral mandible radiogram, 24 weeks.

Pathological evaluation

Microscopic evaluation until 14 days revealed young fibrous tissue filling the bone hole, with the traces of active bone regeneration. There were multiple immature bone trabecules surrounded by osteoblasts and also dead bone fragments with osteoclasts. Later on the 3 and 6 week implant was surrounded by the bone. In the deeper parts of the canal bone trabecules had an osteogenetic activity. After 12 weeks implantation canal was completely filled with the mature bone. After 24 weeks lines of fibrous tissue were crossed by the lines of polymer. There were foreign body inflammation cells with slight inflammatory response. There were also local traces of osteogenetic activity.

In the subcutaneous tissue implant was covered by the thin fibrous capsule. In the 3-6 week capsule was getting thicker and there were no trace of inflammatory response. The similar picture was after 12 weeks. In the 24 week from the wall of the capsule to the implant lines of connective tissue were ingrowing, creating sieve like structure with parts of polymer. There was slight inflammatory effusion.

Observation of the muscles were similar to the subcutaneous tissue. In the early postoperative period there was young fibrous connective tissue with big numbers of blood vessels. Later begin to appear collagen fibers, and after 3 week implant was surrounded with think connective capsule. After 24 weeks similarly to the subcutaneous tissue lines of fibrous tissue begin to ingrowth to the implant creating sieve like structure.

There was no visible changes in the microscopic examination of kidneys and leaver.

The following researches revealed that degradation of PGLA copolymers begin after 3 weeks and after 24 weeks there are steal fragments of the polymers in the body. The products of polymer degradation did not induce local or general pathological changes

pu wykazała obecność młodej tkanki łącznej włóknistej z bogatą siecią włosowatych naczyń krwionośnych wnika-
jącej pomiędzy uszkodzone włókna mięśni poprzecznie pra-
żkowanych. W dalszym etapie w tkance włóknistej pojawiły
się włókna kolagenowe. Po 3 tygodniach obserwacji wokół
wszczepu wytworzyła się gruba bliznowaciejąca torebka
łącznotkankowa zbudowana z włókien kolagenowych i fi-
broblastów. Na obwodzie zmian widoczne były cechy rege-
neracji włókien mięśniowych z pomnożeniem jąder komór-
kowych. Po 6 tygodniach widoczna była torebka z blizno-
waciejącej tkanki łącznej włóknistej wnika-
jącej pomiędzy pęczki włókien mięśniowych. Po 12 tygodniach torebka łącz-
notkankowa była miejscami pogrubiała. Po 24 tygodniach
podobnie jak w przypadku tkanki podskórnej obserwowano
wrastanie pasm tkanki łącznej włóknistej do światła wytwor-
zonej torbieli i przerastanie kopolimeru z wytworzeniem
struktury sitowatej.

W badanych narządach wewnętrznych (nerki i wątroba) nie
wykazano żadnych zmian patologicznych związanych z
zastosowanymi wszczepami.

Wnioski

Z przeprowadzonych badań można wyprowadzić nastę-
pujące wnioski:

1. Proces degradacji badanego polimeru rozpoczął się już
w 21 dobie, a w 24 tygodniu obecne były jeszcze nieliczne
jego fragmenty.
2. Produkty rozpadu kopolimeru nie wywołują miejscowych
i ogólnoustrojowych zmian patologicznych.

WPŁYW WIELKOŚCI PORÓW RESORBOWALNYCH GĄBEK PGLA NA ODPOWIEDŹ TKANKOWĄ. BADANIA IN VIVO

ELŻBIETA MENASZEK*, ELŻBIETA PAMUŁA**

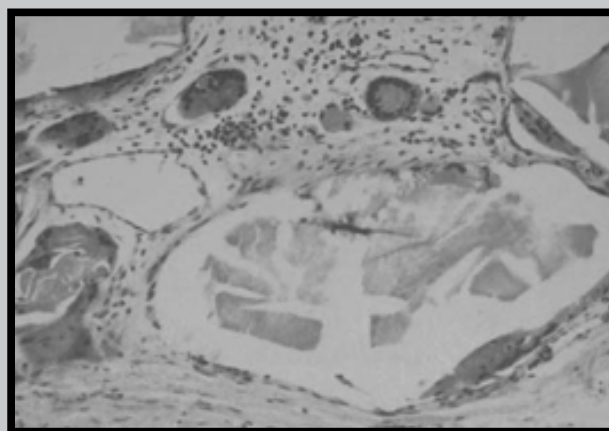
*UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDICUM,
ZAKŁAD CYTOBIOLOGII I HISTOCHEMII,
UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKÓW.

**AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA,
WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW.

[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),221-223]

Wstęp

Biomateriały polimerowe wykorzystuje się w medycynie
od ponad 50 lat. Jedną z grup polimerów biomedycznych
są resorbowalne poliestry alifatyczne (poli- α -hydroksykwa-
sy), do których zaliczany jest kopolimer glikolidu z L-lakty-
dem (PGLA). W środowisku tkankowym PGLA jest rozkła-
dany z wytworzeniem nietoksycznych związków: kwasu gli-
kolowego i mlekowego. Produkty te poprzez cykl Krebsa
są usuwane z organizmu w postaci dwutlenku węgla i wody.
Zastosowanie trójwymiarowych, porowatych rusztowań
zasiedlonych komórkami, wszczepianych w miejsce uby-
tku tkankowego, stwarza dogodne warunki dla odbudowy
tkanki. Porowate implanty - gąbki mają za zadanie wspie-
rać trójwymiarowe formowanie tkanki [1]. Hodowlę komó-



RYS. 2. Widoczne komórki typu około ciała obcego
wokół złogów polimeru. 24 tydzień (HE,200x).

FIG. 2. Foreign body cell surrounding polymer
particles. 24 week (HE,200x).

Piśmiennictwo

References

- [1] Bessho K., Iizuka T., Murakami K-I.: Bioabsorbable Poly-L-Lac-
tide Miniplate and Screws System for Osteosynthesis in Oral and
Maxillofacial Surgery. J. Oral. Maxillofac. Surg. 1997, 55, 941-945.
- [2] Chłopek J., Kmita G., Dobrzyński P., Bero M.: Właściwości zmę-
czeniowe śrub z kopolimeru P(LLA/GLA) oraz kopolimeru wzmac-
nianego włóknem węglowym. Inż.Biomat. 2002,23,24,25,88-90.

THE EFFECT OF PORE SIZE OF RESORBABLE PGLA FOAMS ON THE TISSUE RESPONSE. IN VIVO STUDY

ELŻBIETA MENASZEK*, ELŻBIETA PAMUŁA**

*JAGIELLONIAN UNIVERSITY, COLLEGIUM MEDICUM,
DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY AND HISTOCHEMISTRY,
9 MEDYCZNA ST., 30-068 KRAKÓW.

**AGH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS,
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
30 MICKIEWICZA AVE., 30-059 KRAKÓW.

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),221-223]

Introduction

Polymeric biomaterials have been used in medicine for
more than 50 years. Among the biomedical polymers there
is a family of resorbable aliphatic polyesters (poly- α -
hydroxyacids) to which the copolymer of glycolide and L-
lactide (PGLA) belongs. In vivo PGLA is degraded into non-
toxic compounds: lactic and glycolic acid. Degradation prod-
ucts of PGLA are removed from the body via normal meta-
bolic pathways (Crebs cycle) in the form of carbon dioxide
and water. The use of three-dimensional scaffolds settled
with cells and next implanted into the place of tissue loss
creates good conditions for the tissue regeneration. The
aim of porous implants - foams is to support the three-di-
mensional tissue formation [1]. The culture of cells is started

rek rozpoczyna się na porowatej strukturze w warunkach in vitro i przenosi utworzony konstrukt w miejsce ubytku tkankowego. Dla prawidłowego rozwoju tkanki niezbędny jest właściwy rozmiar i ciągłość porów, które umożliwiają kontakt komórek, dyfuzję składników odżywczych i metabolitów oraz prawidłową angiogenezę. W miarę rozwoju nowej tkanki implant ulega stopniowej degradacji [2].

Celem pracy było określenie, jak mikrostruktura otrzymanych podłoży, a w szczególności wielkość porów, wpływa na proces regeneracji tkanek w warunkach in vivo.

Metody

Bioresorbowalne gąbki z PGLA zsyntezowanego wg metody opisanej uprzednio [3], o różnym rozmiarze porów, otrzymano metodą odlewania z roztworu i wypłukiwania cząsteczek [4]. Jako porogenu użyto ziaren chlorku sodu (rozmiar 200 ± 40 mm) i cytrynianu sodu (rozmiar 600 ± 100 mm). Przy różnym rozmiarze porów, całkowita objętość porów była taka sama dla obu gąbek [5]. Eksperyment przeprowadzono na szczurach rasy Hooded Oxford chowu wsobnego, którym pod narkozą i w warunkach sterylnych wprowadzano kawałki gąbek o wielkości 4 mm x 2 mm x 2 mm do naciętego mięśnia udowego. Zwierzęta podzielono na grupy w zależności od długości trwania eksperymentu: 7, 30, 90, 150 i 210 dni. Po upływie danego czasu zwierzęta uśmiercano i pobierano wycinek mięśnia wraz z implantem. Tkanekę zamrażano w ciekłym azocie a następnie skrawano przy użyciu kriostatu. Na uzyskanych skrawkach tkankowych wykonano reakcje histochemiczne i histologiczne w celu oceny stanu czynnościowego tkanek, procesu zabudowy tkankowej implantu oraz stopnia nasilenia stanu zapalnego wokół ciała obcego, jakim jest implant.

Wyniki i dyskusja

Na podstawie obserwacji mikroskopowych wykonanych preparatów stwierdzono lepszą zabudowę tkankową w przypadku gąbki o mniejszych porach. Różnice, które zaznaczyły się już w serii 30-dniowej, w kolejnych seriach stawały się coraz bardziej widoczne. Zabudowa wszczepu była

in vitro na porowatej strukturze of scaffold and next the obtained construct is placed in the site of the tissue loss.

To submit the proper growth of the tissue, the pores should be interconnected and large enough to permit cellular migration, diffusion of nutrients and metabolites, and the proper angiogenesis. As the new tissue is developing the implant undergoes gradual degradation.

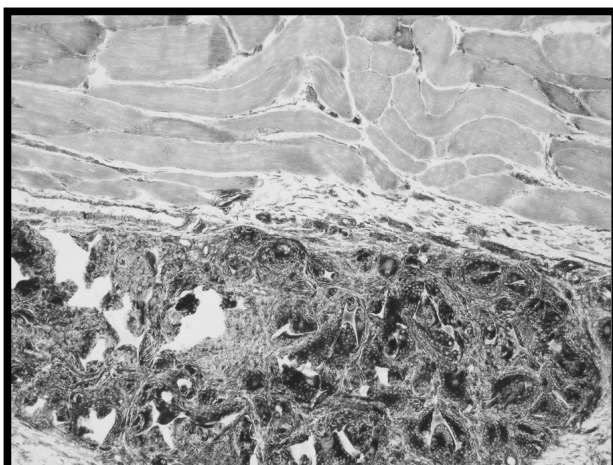
The purpose of the study was to evaluate the effect of scaffold microstructure, especially the pore size on the process of tissue regeneration in vivo [2].

Methods

Copolymer of glycolide and L-lactide was synthesized in the Centre of Polymer Chemistry, Polish Academy of Sciences, Zabrze, according to a method described previously [3]. Bioresorbable PGLA foams with different pore size were produced through a solvent casting / particulate leaching technique [4]. Sodium chloride and sodium citrate particles were used as porogens (pore size: 200 ± 40 mm and 600 ± 100 mm respectively). The volume fraction of pores was the same for both types of foams [5]. The study was performed on inbred Hooded Oxford rats. Pieces of foams (4 mm x 2 mm x 2 mm) were implanted into the cut gluteal muscles under anaesthesia and in sterile conditions. The in vitro study was approved by Bioethics Committee.

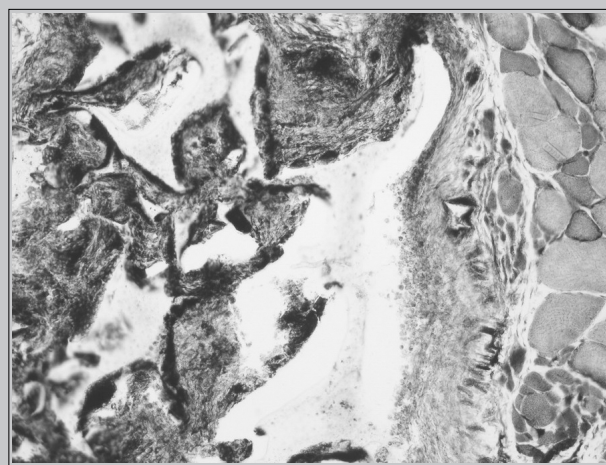
Animals were divided into groups, depending on the duration of the experiment: 7, 30, 90, 150 and 210 days. After the expiry of a time period animals were sacrificed and tissue blocks containing the biomaterial were excised. Samples were frozen in liquid nitrogen and cut into 8mm thick slides in a cryostat microtome. On the obtained slides histological and histochemical reactions were carried out to estimate the metabolic state of tissues, processes of tissue development into and around the implant, and the intensity of inflammation.

Results and discussion



RYS. 1. Przekrój przez mięsień z implantem PGLA (200 ± 40 mm). Reakcja na aktywność dehydrogenazy NADH, seria 210 dni. Powiększenie 10x.

FIG. 1. The cross-section through the muscle with PGLA (200 ± 40 mm) implant. The reaction for the NADH dehydrogenase activity, 210-day series. Original magnification 10x.



RYS. 2. Przekrój przez mięsień z implantem PGLA (600 ± 100 mm). Reakcja na aktywność dehydrogenazy NADH, seria 210 dni. Powiększenie 10x.

FIG. 2. The cross-section through the muscle with PGLA (600 ± 100 mm) implant. The reaction for the NADH dehydrogenase activity, 210-day series. Original magnification 10x.

zwarta, gąbka wykazywała większy stopień fragmentacji, wszystkie przestrzenie wypełnione były komórkami. W przypadku gąbki o większych porach, nawet w serii 210-dniowej obserwowano miejsca implantu tylko częściowo wypełnione komórkami.

Badania histoenzymatyczne na aktywność oksydazy cytochromu c i dehydrogenazy zredukowanego koenzymu NAD [6] - kluczowych enzymów łańcucha oddechowego, wykazały aktywność tkanek otaczających implant porównywalną z aktywnością tkanek odległych od implantu. Nie wykazano istotnych różnic między aktywnością tych enzymów dla obu gąbek, co pozwala wnioskować, że wielkość porów nie wpływa na biogodność implantowanego materiału.

Nasilenie stanu zapalnego oceniono na podstawie obserwacji aktywności enzymu lizosomalnego - fosfatazy kwasnej [7] oraz liczebności komórek wpływających na przebieg stanu zapalnego - mastocytów i eozynofili. W serii 7-dniowej nasilenie zapalenia było takie samo w przypadku obu gąbek. W dalszych seriach aktywność fosfatazy kwasnej oraz liczebność wielojądrowych komórek olbrzymich i eozynofili była wyższa wokół gąbek o mniejszych porach. Mogło to być spowodowane większym stopniem degradacji PGLA oraz lepszą penetracją komórek do wnętrza implantu i, co za tym idzie, większą powierzchnią kontaktu tkanki z materiałem.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że regeneracja tkanki mięśniowej i zabudowa tkankowa implantu postępują sprawniej przy użyciu podłoża tkankowego o mniejszym rozmiarze porów (ok. 200 mm), co możemy porównać z wynikami pracy dotyczącej regeneracji tkanki kostnej. Whang i wsp. stwierdzili, że optymalny rozmiar porów dla regeneracji tej tkanki mieści się w zakresie 100-350 mm [8].

Podziękowania

Autorki dziękują Panu Dr P. Dobrzyńskiemu i Panu Doc. M. Bero (Centrum Chemii Polimerów, Zabrze) za dostarczenie próbek kopolimerów. Pracę sfinansowano ze środków budżetowych na naukę w latach 2005-2008 (3 T08D 019 28)

Microscopic analysis of obtained slides shows much better tissue ingrowth into the foam with smaller pores. Differences occurred in 30-day series; in subsequent series became more visible. The newly-formed tissue was compact, the pores were filled with cells, and the foam was in higher degree fragmentized (FIG.1). In the case of the foam with bigger pores, even in 210-day series the places only partly filled with tissue were still seen (FIG.2).

The histoenzymic studies evaluating activity of cytochrome c oxidase and NADH dehydrogenase [6] - the key enzymes of respiratory chain - showed the activity of tissues in close proximity to the implants compared to those further away. Any significant differences between activities of these enzymes of both foams were seen, which indicates that there is no effect of pore size on biocompatibility of implanted materials.

The intensity of inflammation was estimated by observations of the acid phosphatase activity [7] and number of inflammatory cells: mast cells, eosinophils and multinucleated giant cells. In 7-day series the intensity of inflammation was similar for both foams. In further series the acid phosphatase activity and number of multinucleated giant cells and eosinophils were higher around foams with smaller pores. The reason for this may be much better penetration of cells inside the implant and higher surface area of the tissue - biomaterial interface.

Obtained results show much better tissue ingrowth into the foam with the pores of about 200 mm and proper regeneration of muscle tissue around the implant. Our results can be compared to those of Whang et al., who stated that the optimal pore size for the bone tissue regeneration varies between 100 and 350 mm [8].

Acknowledgements

The authors thank Dr P. Dobrzyński and Doc M. Bero (Centre of Polymer Chemistry, Polish Academy of Sciences, Zabrze) for providing the copolymer samples. This study was supported by the Polish Budget Funds for Scientific Research within the years 2005-2008, as a research project No 3 T08D 019 28

Piśmiennictwo

- [1] Ma P.X. (2004) *Materials Today* 7(5): 30-40.
- [2] Yang S., Leong K.-F., Du Z., Chua C.-K. (2001) *Tissue Engineering* 7: 679-689.
- [3] Dobrzyński P., Kasperczak J., Janeczek J., Bero M (2001) *Macromolecules*: 5090-5098.
- [4] E. Pamuła, M. Błażewicz, B. Czajkowska, P. Dobrzyński, M. Bero, J. Kasperczyk, (2004) *Annals of Transplantation* 9(1A) Suppl., 64-67.

References

- [5] Pamuła E., Błażewicz M., Buczyńska J., Czajkowska B., Dobrzyński P., Bero M. (2003) *Inżynieria Biomateriałów* 30: 95-99.
- [6] Pearse E.A.G. (1991) *Histochemistry Theoretical and Applied*. Tom 3. Wyd. Churchill Livingstone, Longman Group.
- [7] Goldberg A.F., Barka T. (1962) *Nature* 195: 297.
- [8] Whang K., Healy E., Elenz D.R. (1999) *Tissue Engineering* 5: 35-45.

WPŁYW MATERIAŁÓW ZOL-ŻELOWYCH NA HODOWLE KOMÓRKOWE

IWONA HOŁOWACZ*, ANNA MARCINKOWSKA**,
HALINA PODBIELSKA*, JOANNA BAUER*, TERESA BANAŚ**

*GRUPA BIO-OPTYKI, INSTYTUT FIZYKI,
POLITECHNIKA WROCŁAWSKA,
50-370 WROCŁAW, WYBRZEŻE WYSPIAŃSKIEGO 27

**KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII LEKARSKIEJ,
50-368 WROCŁAW, UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 10
[Inżynieria Biomateriałów, 47-53,(2005),224-225]

Wstęp

Biomateriały zol-żelowe znajdują coraz liczniejsze zastosowania [1,2,3,4]. Dlatego ważne staje się badanie ich wpływu na obiekty biologiczne. W niniejszej pracy przedstawiano rezultaty badań na komórkach hodowanych na materiałach zol-żelowych o różnej zawartości etanolu.

Materiał

Hydrolizaty do produkcji zol-żeli przygotowano z prekursora tetraetoksylanu $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ 98% TEOSu (Aldrich). Rozpuszczalnikiem był alkohol etylowy 96% (Polskie Odczynniki Chemiczne S.A.). Reakcję hydrolizy katalizowano silnie stężonym kwasem solnym HCl 36% (POCH), dodawano kolejno po 5 μl do uzyskania pH 2. Do hydrolizatu dodano środek powierzchniowo czynny Triton X-100 (Aldrich), na każde 10ml hydrolizatu dodano 20 μl detergentu. Hydrolizę przeprowadzano mieszając składniki na mieszadzie magnetycznym przez 8 godzin w temperaturze 22oC. Wytworzono materiały o współczynniku R=5, 10, 15, 20, 32, 40, 50, gdzie R oznacza stosunek liczby moli rozpuszczalnika do liczby moli prekursora R [5].

Badanie wpływu materiałów zol-żelowych na komórki linii Jurkat i A549

Przygotowanie podłoża

Przygotowano dwie serie płytek hodowlanych z okrągłymi dołkami firmy Nunclon Company, na które naniesiono różne warstwy zol-żeli. W pierwszej serii (A) na dno dołków naniesiono po 10ml hydrolizatu zol-żelowego. W drugiej serii (B), do dołków hodowlanych wklepiono 15ml hydrolizatu, następnie po 5 minutach, gdy pierwsza warstwa już była sucha, naniesiono kolejne 15ml hydrolizatu; w ten sposób na dno dołka powstały dwie warstwy. Dla serii A i B wykonano podwójne próbki, przy czym jeden rząd (każdy rodzaj materiału) po zżelowaniu przemyto płynami hodowlanymi (odpowiednimi dla danej linii komórkowej) przed naniesieniem komórek, natomiast drugi pozostawiono nieprzemyty.

Materiał biologiczny

Badania przeprowadzono na komórkach nowotworowych ludzkich linii limfoblastycznej chłoniaka T komórkowego - Jurkat, rosnących w toni medium oraz linii epitelialnej raka płuc - A549, przylegających w hodowli do podłoża. Dla linii Jurkat używano medium RPMI-1640 (R8758) firmy Sigma z dodatkiem 10% FBS (Fetal Bovine Serum) firmy Cambrex. Dla linii A549 zastosowano medium MEM (Minimum Essential Medium Eagle M2279) firmy Sigma z suplementacją 0,292 g/l glutaminą i 10% FBS. Komórki do doświadczeń pobrano z butelek hodowlanych, hodowla komórek znajdowała się w II fazie logarytmicznej wzrostu. Do dołków hodowlanych z warstwami zol-żeli naniesiono po 1 ml zawiesiny komórek w odpowiednim medium. Kontrole stanowiły analogiczne hodowle, założone w

INFLUENCE OF SOL-GEL BIOMATERIALS ON BIOLOGICAL CELLS GROWTH IN VITRO

IWONA HOŁOWACZ*, ANNA MARCINKOWSKA**,
HALINA PODBIELSKA*, JOANNA BAUER*, TERESA BANAŚ**

*BIO-OPTICS GROUP, INSTITUTE OF PHYSICS,
WROCŁAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
WYBRZEŻE WYSPIAŃSKIEGO 27, 50-370 WROCŁAW, POLAND

**DEPARTMENT OF MEDICAL BIOCHEMISTRY, MEDICAL UNIVERSITY,
50-368 WROCŁAW, UL. CHAŁUBIŃSKIEGO 10
[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),224-225]

Introduction

The sol-gel based biomaterials have found many interesting applications [1,2,3,4]. Therefore, it is important to examine their influence on biological materials in view of potential biocompatibility. In this work, the results of examination of cells growth on sol-gel materials prepared with various ethanol content, are discussed.

Material

The hydrolizates for production of sol-gels were prepared from precursor 98% tetraethoxysilan $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ (TEOS from Aldrich). As a solvent 96% ethyl alcohol (from POCh - Polskie Odczynniki Chemiczne S.A.) was used. The hydrolysis was catalyzed by 36% HCl (POCH), added in portions of 5 μl up to the moment when pH=2 was reached. As a surfactant Triton X-100 (Aldrich) in amount of 20 μl on each 10ml of hydrolizate was used. The mixture was stirred 8 hours by means of magnetic stirrer in the temperature 22oC. The following materials were produced: with ratio R = 5, 10, 15, 20, 32, 40, 50, denoting the number of solvent moles to the number of TEOS moles [5].

Examination of sol-gel influence on cells lines Jurkat and A549

Preparation of substrates

Two series of samples were prepared on bottom-plates (circulars from Nunclon Company) that were covered by sol-gels. In the first group (A), 10ml liquid sol-gel was deposited in each hole. In a group B, 15ml hydrolizate was deposited, and after 5 minutes, when the first layer was dried, next layer with the same amount of sol-gel was created. After polycondensation of sol-gels, the tested cells were seeded.

Biological materials

Two types of cells were cultured. The lymphoblastic T lymphoma cells Jurkat grow in the suspension of medium, whereas epithelial lung carcinoma cells - A549, show the superficial growth on substrate. For Jurkat cells the typical medium RPMI-1640 (R8758) from Sigma with addition of 10% FBS (Fetal Bovine Serum) from Cambrex, was applied. For A549 cells, the medium MEM (Minimum Essential Medium Eagle M2279) from Sigma supplemented with 0,292 g/l glutamine and 10% FBS, was used. The 1 ml cells suspension in corresponding medium was seeded on sol-gels. As a control, the cells seeded on plates without sol-gels were taken. Some of the sol-gels, prior to cells seeding, were pre-washed with corresponding culture medium. The plates were incubated in the temperature of 37°C in the atmosphere of 5% CO₂ for 48 hours.

Results

First, the Jurkat cells on sol-gels were evaluated micro-

dołkach nie pokrytych materiałem. Płytki umieszczono w inkubatorze w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂ na 48 godzin.

Wyniki

Komórki linii Jurkat hodowane na pojedynczych cienkich warstwach zol-żelowych w badaniu mikroskopowym wyglądały prawidłowo, po przeliczeniu nie wykazano istotnych różnic ilościowych, komórki mnożyły się.

Komórki linii A549 rosnące w postaci monowarstwy przykleiły się do podłoża zol-żelowych, nie było możliwe ich odklejenie i wiarygodne policzenie. Jednak wygląd utworzonych monowarstw, oglądanych pod mikroskopem, nie wskazywał na różnice ilościowe w zależności od rodzaju zol-żelu. Wygląd komórek był prawidłowy, obserwacja ta wskazuje na brak istotnych toksycznych wpływów warstw zol-żelowych na komórki.

Warstwy zol-żeli serii B uległy znacznym deformacjom, uniemożliwiając zebranie komórek do badań ilościowych. Mikroskopowa ocena komórek wskazywała jednak na brak wpływów cytotoksycznych zol-żeli, nie zaobserwowano martwych komórek.

Cytotoksyczność badano używając testu TOX-1 firmy Sigma, w którym dehydrogenazy mitochondrialne, tylko dla komórek z aktywnymi metabolicznie mitochondriami, powodują przekształcenie żółtego barwnika MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) w nierozpuszczalne w wodzie niebieskofioletowe formazany, które po rozpuszczeniu w mieszaninie 10% TritonX-100/0,1N HCl/ izopropanol oznaczono za pomocą spektrofotometru ($\lambda=570\text{nm}$) [6,7]. Wyniki badań porównano z absorpcją dla próbek kontrolnych. Test przeżywalności komórek linii Jurkat na warstwach zol-żelowych wykazał brak istotnego wpływu obecności zol-żeli na proliferację i żywotność komórek. Nie wykazano również wpływu przemycania warstw zol-żeli przed naniesieniem komórek na ich żywotność. Najlepszą zgodność testu uzyskano dla materiału o współczynniku $R=20$.

Wykonano również badania nad apoptozą komórek metodą kometową [8]. Zastosowano pięciostopniowy system rozpoznawania uszkodzeń w/g Shingo Yassuhara [9]. Nie wykazano istotnego wpływu zol-żeli na komórki linii Jurkat. Nie wykazano również wpływu przemycania materiału przed naniesieniem na niego komórek oprócz zol-żelu o współczynniku $R=40$. Najmniejszy wpływ na skłonność komórek do śmiertelnych uszkodzeń na drodze apoptozy czy uszkodzeń niezidentyfikowanych miał materiał o współczynniku $R=20$. Zaobserwowano również, że materiał o tym współczynniku, niezależnie od grubości warstwy pozostawał przezroczysty w trakcie oddziaływania z medium hodowlanym i komórkami, nie wpływał na przejrzystość komórek, pozostał całkowicie obojętny biologicznie względem komórek linii JURKAT.

Otrzymane wyniki świadczą o tym, że odpowiednio przygotowany materiał zol-żelowy nie wykazuje właściwości cytotoksycznych.

Podziękowania

Badania wykonano częściowo w ramach grantu KBN No. 4T11E01124.

scopically. They demonstrated the proper structure, ability to growth and no statistically significant difference when comparing to control group.

The A549 cells grew as a monolayer on sol-gel substrates and it was not possible to separate them from these substrates, therefore the quantitative analysis was not conducted. However, in the qualitative microscopic evaluation, there was no difference between cells on sol-gels and in the control group. The influence of type of sol-gel (here meaning R factor, what corresponds to ethanol content) was not observed, as well.

In the group B (double layered sol-gels) the cells grew into the sol-gel material, which was deformed, so it was difficult to harvest them for quantitative analysis. However, non cytotoxic effects were observed.

Cytotoxicity was examined by means of TOX-1 test from Sigma, based on transformation of yellow dye MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) into hydrophobic formazanes, which can be examined spectrophotometrically after dissolving in mixture of 10% TritonX-100/0,1N HCl/ isopropanol ($\lambda=570\text{nm}$) [6,7]. This transformation takes place in cells with metabolically active mitochondria, only.

The results were compared with absorption for control group. In case of Jurkat cells, no differences in proliferation when comparing to control group, were stated. However, the best results were observed for sol-gel materials prepared with ratio $R=20$. Additionally, the apoptosis was examined by means of comet assay [8], by using the method of Shingo Yassuhara for damage detection [9].

Also in this case, no influence of sol-gels on Jurkat cells was observed. Slightly difference was observed for material with $R=40$, regarding the prewashed and non pre-washed substrates. The lowest number of changes in cells was observed for sol-gel with ratio $R=20$, which was absolutely neutral.

These results clearly demonstrate that it is possible to produce non-cytotoxic sol-gel material.

Acknowledgements

The support of the Polish Ministry of Science, Grant KBN No. 4T11E01124 is gratefully acknowledged.

Piśmiennictwo

References

- [1] Boettcher H.: Bioactive sol-gel coatings, J. Prakt. Chem. 342, 427-436, (2000).
- [2] Kim H-W., Kim H-E., Knowles J.C.: Fluor- hydroxyapatite sol-gel coating on titanium substrate for hard tissue implants, Biomaterials 25, 3351-3358, (2004).
- [3] Gan L., Pilliar R.: Calcium phosphate sol-gel-derived thin films on porous-surfaced implants for enhanced osteoconductivity. Part I: Synthesis and characterization, Biomaterials 25, 5303-5312, (2004).
- [4] Podbielska H., Ulatowska-Jarza A., Holowacz I., Sol-gel applicators for medical light therapy, Physica Medica, Vol. XX, Supplement 1, 2004, 43-45.
- [5] Brinker C.J., Scherer G.W.: Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing. Academic Press, San Diego (1990).
- [6] Carmichael J., et al.: Evaluation of tetrazolium-based, semi-automated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, Cancer Res., 47: 936-942 (1987).
- [7] Denizot F., Lang R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, J. Immunol. Meth., 89: 271 (1986).
- [8] Olive P.L., Frazer G., Banath J.P.: Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay, Radiat. Res., 136: 130-136 (1993).
- [9] Shingo Yasuhara, et al.: Comparison of comet assay, electron microscopy and flow cytometry for detection of apoptosis, J. Histochemistry and Cytochemistry, 51: 873.

MECHANICAL PROPERTIES OF CHEMICALLY AND PHYSICALLY CROSSLINKED POLY(VINYL ALCOHOL) CRYOGELS

MIROSLAWA EL FRAY*, WOJCIECH ŚWIĘSZKOWSKI**, KRZYSZTOF J. KURZYDŁOWSKI**

*SZCZECIN UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLYMER INSTITUTE, SZCZECIN, POLAND

**WARSAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, FACULTY OF MATERIALS ENGINEERING, WARSAW, POLAND
[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),226-227]

Introduction

Poly(vinyl alcohol) (PVA) is one of the most popular macromolecule capable of hydrogel structure formation [1]. PVA hydrogels are weak materials therefore their structure is stabilized by chemical crosslinking with glutaraldehyde, acetaldehyde, formaldehyde and other monoaldehydes [2] in the presence of sulfuric acid, acetic acid or methanol. This method of crosslinking is not suitable, however, for biomedical or pharmaceutical applications because of residual amount of toxic crosslinking agents or catalyst which can be leached out. Therefore, to eliminate toxic and elutable agents from hydrogels, another chemical methods of crosslinking can be used, including electron beam or γ -irradiation [3,4].

An alternative method of hydrogel's preparation without using toxic additives, is the freezing-thawing process in cycles repeated up to several times [5]. In this process aqueous solutions of PVA are frozen at $-20^{\circ}\text{C} \pm 2$ and then thawed at room temperature, with formation of crystallites [6]. Such variables as number of freezing-thawing cycles, time of each operation and also molecular weight and concentration of PVA determine final properties of produced cryogels [7,8].

In order to improve mechanical strength of hydrogels, we used low molecular weight, biocompatible molecules of di- and multifunctional metabolites such as succinic acid and gluconic acid as crosslinking agents, thus eliminating problem of toxicity associated with conventional chemical crosslinkers such as aldehydes. These low molecular weight functional metabolites can form additionally hydrogen bonds in the PVA network. The systems were subjected to the freezing/thawing process, which can finally lead to cryogels of mechanical properties useful for articular cartilage repair.

Experimental

Preparation of hydrogels by combined chemical and physical process

PVA with $M_n=48\ 400$ - $52\ 800$ Da and $M_w=89\ 500$ - $97\ 700$ Da (Elvanol, du Pont with degree of hydrolysis 99-99,8%) was used to prepare an aqueous solutions of 25 wt% PVA with 3 wt% gluconic acid (Aldrich, aqueous solution 45-50%) and 25 wt% PVA with 3 wt% succinic acid (Aldrich, powder 99%). Samples were heated in an oven at 90°C for 12-16 hours. Hydrogel solutions were placed in teflon moulds in order to prepare samples for mechanical testing. Samples were subjected to freezing at -18°C for 12 h and thawing at 18°C for 12 h for 4, 7, and 9 cycles.

Mechanical testing

Compression tests of prepared hydrogels were performed

on MTS QTest10 apparatus at crosshead speed of 5 mm/min according to EN ISO 604:2002 standard. Compressive stress was determined at 60% strain. Additionally, relation between compression strength of the hydrogel and number of freezing-thawing cycles applied during material production was investigated. Results were averaged from 4-6 samples.

Results and discussion

PVA hydrogels blends containing succinic and gluconic acids, respectively, subjected to freezing-thawing process were relatively strong, white materials. It is already known from the literature, that cryogel's properties, especially the degree of crystallinity is highly dependent on the number of freezing-thawing cycles [5,9]. Therefore novel blends were subjected to variable number of cycles in order to find the correlation between the overall mechanical properties and number of freezing-thawing cycles.

It has been found that mechanical properties of produced blends were strongly dependent on the crosslinking density. FIGURE 1 shows that blend containing gluconic acid has the highest values of compressive strength, which increases with increasing number of freezing-thawing cycles. It is worth noting that these values are higher as compared to the PVA/PVP system, already described in the literature (the highest crosslinking density has been found for this system among all prepared blends).

It has been also found that blends containing metabolite's molecules were characterized by elastic modulus of $E_c=7.23$ - 14.09 MPa at 60% strain (FIG.2), what compares very well

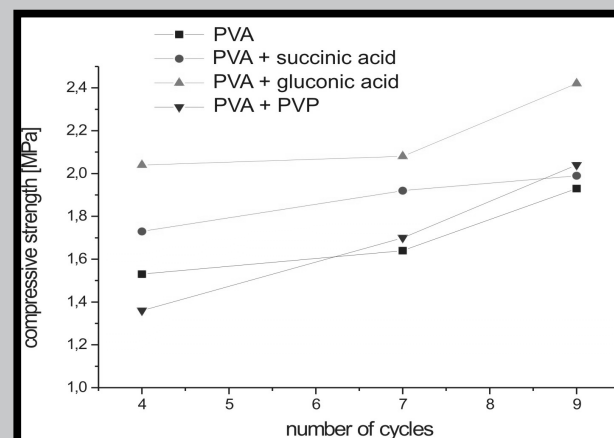


FIG. 1. Compressive strength as a function of freezing-thawing cycles.

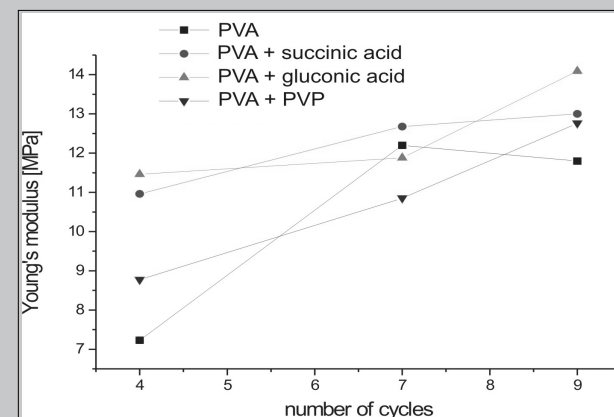


FIG. 2. Young's modulus at 60% strain as function of freezing-thawing cycles.

to properties of natural articular cartilage ($E_c=1.9-14.4$ by 30% of strain [12]).

Conclusions

PVA hydrogels were prepared by combined chemical and physical process including chemical reaction between PVA and low molecular weight metabolite molecules, such as succinic and gluconic acid, respectively, followed by repeated freezing-thawing cycles. The highest compressive stress has been found for a blend containing 25% PVA and 3% gluconic acid after four cycles. After nine cycles, this blend showed still higher values as compared to the neat 25% PVA cryogel and PVA/PVP system (the last one was characterized by the highest crosslinking density). We demonstrated that usage of di- and monofunctional metabolites as crosslinking agents for PVA hydrogel in combination with repeated freezing-thawing process is an effective method for preparation of strong cryogels. Their mechanical properties compare very well with these of natural cartilage and can be considered for articular cartilage reconstruction.

Acknowledgements

This work was financially supported by grant 3T08E02527

References

- [1] Osada Y., Kajiura K.: Gels Handbook, Academic Press, London 2001.
- [2] Hassan C.M.; Peppas N.A.; Adv. Polym. Sci., 2000, 153: 37.
- [3] Danno A.; J. Phys. Soc. Jpn, 1958, 13: 722.
- [4] Sakurada I.; Mori N.; Seno Gakkaishi, 1959, 15: 948.
- [5] Stauffer S.R.; Peppas N.A.; Polymer, 1992, 33: 3932.
- [6] Peppas N.A.; Makromol. Chem., 1975, 176: 3433.
- [7] Hickey A.S.; Peppas N.A.; J. Membr. Sci., 1995, 107: 229.
- [8] Lozinsky V.I.; Solodova E.V.; Zubov A.L.; Simenel I.A.; J. App. Polym. Sci, 1995, 58: 171.
- [9] Peppas N.A.; Scott J.E.; J Control. Rel., 1992, 18: 95.
- [10] Peppas N.A.; Hansen P.J.; J. App. Polym. Sci., 1982, 27: 4784.
- [11] Thomas J.; Lowman A.; Marcolongo M.; J. Biomed. Mater. Res., 2003, 67: 1329.
- [12] Stammen J.A.; Williams S.; Ku D.N.; Guldberg R.E.; Biomaterials, 2001, 22: 799.

• • • • •

REPEATABILITY OF SOL-GEL BIOCOATINGS ON OPTICAL FIBERS EXAMINED BY STATISTICAL PATTERN RECOGNITION METHODOLOGY

JOANNA BAUER*, HALINA PODBIELSKA*,
AGNIESZKA ULATOWSKA-JARZA*, IWONA HOLOWACZ*,
GEHARD MÜLLER**, JÜRGEN BEUTHAN**

*BIO-OPTICS GROUP, INSTITUTE OF PHYSICS,
WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY,
WYBRZEZE WYSPIANSKIEGO 27, 50-370 WROCLAW, POLAND

**CHARITE UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN,
CAMPUS BENJAMIN FRANKLIN,
INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE PHYSIK UND LASERMEDIZIN,
FABECKSTR. 60-62, D-14195 BERLIN, GERMANY

[Engineering of Biomaterials, 47-53,(2005),227-228]

Introduction

The sol-gel production technology enables to obtain variously shaped materials from liquid precursors. The sol-gel coatings are the subject of many examinations, since they can find plethora of applications [1,2,3,4]. Coated subjects may gain new characteristics [5,6,7,8], like corrosion resistance [9], improved biocompatibility [10] or better electrical insulating properties [11]. Silica based sol-gel coatings may be used for production of fiberoptic applicators for laser therapies [12]. Interstitial laser thermotherapy is a quite new treatment of pathologic tissues in difficult to access environments (e.g. brain, liver), whereas the applicator is inserted into the pathologic lesion and curing laser light is guided through the fiber [13]. The other area of applications are bio- and chemosensors. This work presents the results of examination of sol-gel biocoatings surfaces.

Experimental

Materials

Sol-gel coatings were produced from solvents and reagents obtained from commercial sources and used without further purification: 96% ethyl alcohol (Merck), 98% tetraethylorthosilane (TEOS) (Fluka) and 37 % hydrochloric acid (Merck). The various coatings were prepared with R ratios equal 20, 32, and 40, where R denotes the number solvent moles to number of precursor moles. The HCl was added as the catalyst in proportion to ensure the acid hydrolysis ($pH=2$). The mixture was stirred for 4 hours by means of magnetic stirrer with the speed 400 rot/min at the room temperature. Optical fibers from Thorlabs (Hard Clad Silica, low OH) were used (core diameter $\phi_1=400 \mu m$, HCS cladding $\phi_2=430 \mu m$ with external coating $\phi_3=730 \mu m$). First, the external jacket was mechanically removed on the distance of 2 cm. Next, the cladding was removed chemically by acetone and washed with ethyl alcohol. The sol-gel coatings were produced from freshly prepared hydrolyzates by dip-coating method, whereas the bar fiber tip was placed in liquid hydrolyzate, which flow out from the container in the controlled manner (the outflow speed was calculated).

Procedures and methodology

All prepared fibers (20 for each ratio R) were dried for 24 hours in room temperature. After that, the microscopic pictures were taken by means of microscope (Nikkon optical microscope with PC interfaced digital camera) and stored in PC for further processing. The preprocessing was applied in order to obtain images compressed to 80x80 pixels bitmaps. The Linear Discriminant Analysis (LDA) for the feature selection and dimensionality reduction of data was exploited [14]. Then the classification based on Single Linkage method was performed. The picture in statistical pattern recognition methods is treated as a two-dimensional array of intensity values $I(x,y)$. The recognition process was performed in order to find out the similarity between images. We divided the data base into 3 groups (corresponding to the types of applicators; one group for one R).

Results and discussion

The recognition procedure was applied to find out in which group the similarity score was the highest one. The higher the number of similar images, the higher is the repeatability of production process, thus the better quality of coatings. FIGURE 1 shows light distribution around the sol-gel coated applicator. The exemplary microscopic image of the coating surface is depicted by FIG.2.

• • • • •

The methodology called Face Recognition Vendor Test (FRVT) as used for assessment of face recognition technologies, was here applied for evaluation of the recognition system performance [15]. When an image is correctly recognized as belonging to the group with certain R factor, the performance measure for this case is the True Acceptance Rate (TAR). The second case is when the image is wrongly recognized as belonging to the certain R group (False Acceptance Rate - FAR). Next case is when the image from Rx group is wrongly classified as belonging to Ry (False Rejection Rate - FRR) and the last possibility - when the image is correctly rejected (True Rejection Rate - TRR). In our work, the Equal Acceptance Rate (EAR) was a measure of system general performance (EAR is the rate at which the TAR is exactly equal to the TRR). The higher is EAR, the better is the recognition, meaning the higher number of similar coatings was detected. After statistical analysis we stated that the quality sol-gel biocoatings on optical fibers depends on the R ratio. The higher is R, the smaller number of images were recognized as belonging to the proper R group. It means that the differences between sol-gel coatings surface images were bigger. In our experiment we stated that for R=20, the EAR is 93%, for R=32 it is 89%, and for R=40, EAR is the lowest one and equals 83%.

Conclusions

The obtained results show that if the hydrolizate contains more solvent (Ethyl alcohol in our case), the drying procedure (even not forced) caused that the sol-gel coatings were not so homogenous (it was more difficult to achieve the repeatability of production process). We have demonstrated that it is possible to produce homogeneous sol-gel biocoatings with high repeatability, providing that the proper properties between solvents and precursor are ensured.

Acknowledgements

The support of the Polish Ministry of Science, Grant KBN No. 4T11E01124 is gratefully acknowledged.

A. Ulatowska-Jarza and H. Podbielska are former Alexander von Humboldt Foundation research fellows. The support of Research and Development Project "Multilayer interferometric spectrometer on the basis of porous silicon" is gratefully acknowledged, as well.

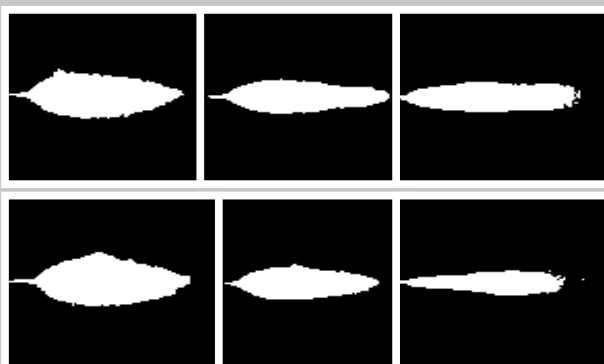


FIG. 1. The light distribution from sol-gel coated fibers (R= 20, 32, 40).



FIG. 2. The microscopic image of surface of sol-gel coated applicator tip. (R=32).

References

- [1] B. Surowska, J. Bieniaś, M. Walczak, K. Sangwal, A. Stoch: Microstructure and mechanical properties of ceramic coatings on Ti and Ti-based alloy, *Applied Surface Science* 238, 288-294, (2004).
- [2] Y. Xie, H.M. Hawthorne: Measuring the adhesion of sol-gel derived coatings to a ductile substrate by an indentation-based method, *Surface and Coatings Technology* 172, 42-50, (2003).
- [3] W. Que, X. Hu: Optical and mechanical properties of sol-gel silica-titania hard optical coatings derived from methyltrimethoxysilane and tetrapropylorthotitanate as precursors, *Optical Materials* 22, 31-37, (2003).
- [4] M. Lechna, I. Holowacz, A. Ulatowska, H. Podbielska, Optical properties of sol-gel coating for fiberoptic sensors, *J. Surface and Coatings Technology*, vol.151-152, pp.299-302, (2002).
- [5] M.J. Paterson, B. Ben-Nissan: Multilayer sol-gel zirconia coatings on 316 stainless steel, *Surface and Coatings Technology* 86-87, 153-158, (1996).
- [6] D-M. Liu, Q. Yang, T. Troczynski: Sol-gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrates, *Biomaterials* 23, 691-698, (2002).
- [7] W. Que, Z. Sun, Y. Zhou, Y.L. Lam, S.D. Cheng, Y.C. Chan, C.H. Kam: Preparation of hard optical coatings based on an organic/inorganic composite by sol-gel method, *Materials Letters* 42, 326-330, (2000).
- [8] S. Sakka, H. Kozuka: Sol-gel preparation of coating films containing noble metal colloids, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 13, 701-705, (1998).
- [9] C. Garcia, P. Galliano, S. Cere: Electrochemical evaluation of resistance to localised corrosion of vitreous coatings containing particles applied on metallic substrates for biomedical applications, *Materials Letters* 57, 1810-1814, (2003).
- [10] J-X. Liu, D-Z. Yang, F. Shi, Y-J. Cai: Sol-gel deposited TiO₂ film on NiTi surgical alloy for biocompatibility improvement, *Thin Solid Films* 429, 225-230, (2003).
- [11] T. Olding, M. Sayer, D. Barrow: Ceramic sol-gel composite coatings for electrical insulation, *Thin Solid Films* 398-399, 581-586, (2001).
- [12] H. Podbielska, A. Ulatowska-Jarza, I. Holowacz, Sol-gel applicators for medical light therapy, *Physica Medica*, Vol. XX, Supplement 1, 2004, 43-45.
- [13] E. Rohde, I. Mesecke von Rheinbaben, H. Podbielska, M. Hopf, G. Mueller: Interstitial Laser-Induced Thermo-therapy (LITT): Comparison of in-vitro irradiation effects of Nd:YAG (1064nm) and diode (940nm) laser, *Med. Laser Appl.* 16, (2001) 81-90.
- [14] K. Fukunaga: Introduction to Statistical Pattern Recognition, 2nd edition Academic Press, New York, 1990.
- [15] <http://www.frvt.org/FRVT2005/default.aspx>

PHYSIOLOGICAL ROLE OF BONE PIEZOELECTRICITY: RETROSPECT AND PROSPECT

SYED A.M. TOFAIL

MATERIALS AND SURFACE SCIENCE INSTITUTE (MSSI), UNIVERSITY OF LIMERICK, LIMERICK, IRELAND

[*Engineering of Biomaterials*, 47-53,(2005),228-231]

Introduction

It is about five decades now since Iwao Yasuda, a Japanese orthopaedic surgeon, reported a link between the physiology of bone growth and an electrical stimulus [1]. Eiichi Fukada and Iwao Yasuda [2] then related the empirical evidence of electrical potential to piezoelectric property in 1957, since a piezoelectric material, under stress, possess the ability to produce electric charge at its surface. Ideal examples of piezoelectric materials are quartz crystal and Pb-based ceramics. In the converse effect, a piezo-

electric material will produce strain under the influence of an electrical field. Fukada and Yasuda [2] demonstrated that application of a shearing stress along the long axis of bone caused a voltage to appear on bone surfaces parallel to the axis. Later on, in 1962, Bassett and Becker [3] independently found that bone produces electrical signal under the application of a mechanical stress, but they relate this observation to a semiconductor behaviour [4]. Based on the Becker's previous works on electrical regeneration phenomenon, Bassett and Becker [3] conjectured that electrical potentials might be linked with the clinically observed adaptive response that occurs in children with healed malaligned fractures. Later, Shamos and Lavine [5] have reaffirmed that the observed bioelectric effects in bone is of a piezoelectric origin and they explained the importance of physiological functions of such electrical potentials in bone remodelling.

Bone can be considered a 'living biominerals' since it contains living cells. The dynamic process of bone formation and destruction accounts for growth during the development stages of the body and enables its regeneration in case of fracture. Although bone piezoelectricity is considered one of the driving mechanisms of bone growth, its origin is attributed to its organic constituent, namely collagen fibre, which has also been found to be piezoelectric. Collagen fibre and nanocrystals of carbonated hydroxyapatite make up the hierarchical structure of bone. The role of apatite in bone piezoelectricity is not however established. Bone apatite is not generally thought as piezoelectric [6], but there are conflicting results in the literature [7, 8]. A link between piezoelectricity and adaptive response of bone cells has been suggested [9] but the question concerning the proximate origin of piezoelectricity from bone still remains open. Here we review some key experimental and theoretical works performed on bone piezoelectricity and its physiological significance. Several authors have reviewed piezoelectric behaviour of bone [10-15] but the question of the origin of bone piezoelectricity did not receive due attention. Since piezoelectricity is fundamentally related to the crystal structure, order and polarisation as a result of mechanical stress, we emphasise on these aspects of bone. The role the major bone constituents play in determining its piezoelectric potential and the concomitant physiological behaviour will also be discussed.

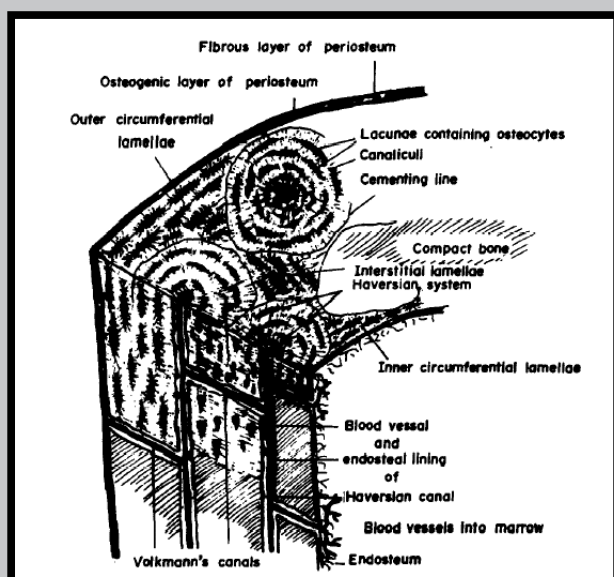


FIG. 1. Basic structure of compact bone [ref. 14 and 16].

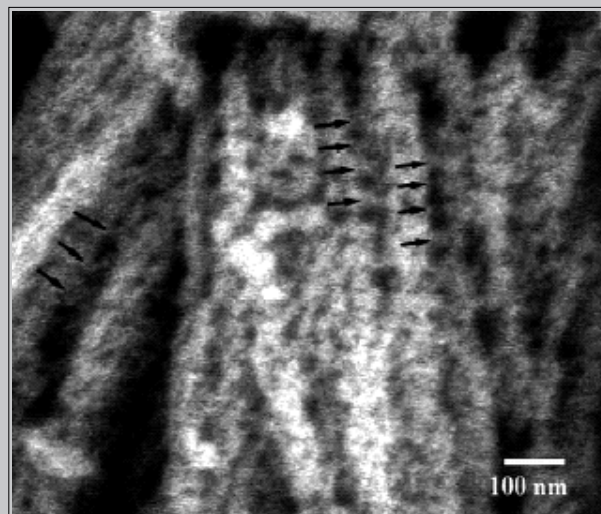


FIG. 2. Bone minerals interleaved with collagen fibres. Arrows indicate crystallites periodically bridging the collagen fibrils [ref. 17].

Bone architecture

The hierarchical structure of bone is composed of nanocrystalline-carbonated hydroxyapatite, collagen fibres (a triple helix polypeptide based protein) and mucopolysaccharides. Bone is highly vascular and has cells called osteocytes, which has the ability to differentiate into new bone forming cells (osteoblasts) and bone resorbing cells (osteoclasts). Osteocytes occupy a small cavity- lacuna, and the fine tunnels (canaliculi) that radiate from lacunas serve as sites for cytoplasmic activities. These canaliculi also give rise to a very densely populated interconnected canal system, which gives bone its characteristic porous and permeable structure [14,16].

Microscopically, a compact bone consists of osteons and interstitial lamellae. Osteon is an irregular-shaped hollow cylinder and consist mainly of finely interleaved collagen fibres and nanocrystalline HA [17]. Osteons also consist voids, which host blood vessels and capillaries along with osteocytes[14]. The osteons are usually oriented parallel to long axis of bone shaft and the walls have a definite lamellar structure. Within each lamella of the osteons, collagen fibres have one predominant direction, while this direction can vary from osteon to osteon.

Bone piezoelectricity and theoretical modelling

Piezoelectricity has been experimentally observed both in dry and wet state. The methods used include inter alia static, quasi static and low frequency dynamic methods using direct piezoelectric effect. Converse piezoelectric effect was also observed. Samples from different origins: human, bovine and horse have been tested. Most of these samples were obtained from femur, for the compactness of sample and convenience in handling. A list of numerical values obtained from these experiments is summarised in ref. 14. It will be useful to discuss some of the fundamentals of piezoelectricity before we start looking into bone piezoelectricity.

Piezoelectricity is a property of crystal that originates from the absence of a centre of symmetry in the crystalline structure. Among the total 32 crystal classes, there are 21 crys-

tal classes that do not possess a centre of symmetry and are piezoelectric [18]. However, the above mentioned point groups are not sufficient for discussing symmetry of physical properties, especially for polycrystalline samples and highly oriented polymers, and consideration of Curie's limiting group with infinite rotation symmetry is required [18]. Mathematically, piezoelectricity is described within a material's constitutive equation, which defines how the piezoelectric material's stress (T), strain (S), charge-density displacement (D), and electric field (E) interact: $\mathbf{S} = \mathbf{s}_e \mathbf{T} + \mathbf{d}^t \mathbf{E}$ and $\mathbf{D} = \mathbf{d}^t \mathbf{T} + \mathbf{e}_T \mathbf{E}$, where, \mathbf{s}_e means the compliance measured under a constant or zero applied electric field, \mathbf{e}_T means that the permittivity measured at constant, or zero applied stress and \mathbf{d} represents a third order tensor and known as piezoelectric strain coefficients. The SI unit for \mathbf{d} is pC N^{-1} , which is a direct measure of generated charge (measured in Coulomb, C) as a function of applied force (measured in Newton, N). The value of piezoelectric polarisation can be directly found from the piezoelectric stress coefficient \mathbf{e} , which is related to the strain coefficient through the materials stiffness \mathbf{c} (a fourth-rank tensor) as: $\mathbf{e}_{nij} = \mathbf{d}_{nkl} \mathbf{c}_{klj}$ (Eq. 1) and measured by the amount of charge generated over a given area (C m^2). The stiffness, \mathbf{c} is related to the compliance, \mathbf{s} by the Kronecker delta as: $\mathbf{c}_{ijpq} \mathbf{s}_{pqkl} = \mathbf{d}_{(ij)(kl)}$. As a third rank tensor \mathbf{d} or \mathbf{e} coefficients have 18 elements. In the matrix notation it is described as:

$$\begin{bmatrix} d_{11} & d_{12} & d_{13} & d_{14} & d_{15} & d_{16} \\ d_{21} & d_{22} & d_{23} & d_{24} & d_{25} & d_{26} \\ d_{31} & d_{32} & d_{33} & d_{34} & d_{35} & d_{36} \end{bmatrix} \quad (\text{Eq. 2}),$$

where 1, 2, 3, 4, 5 and 6 directions are defined as shown in FIG. 3. These 18 coefficients are reduced to a simpler form by considering their symmetry. The original hexagonal hollow-symmetric (A_2 or D_6) symmetry for bone proposed by Fukada [2] had only the d_{14} coefficient to measure. This symmetry, which was later found wrong, suggested that bone should not exhibit pyroelectricity. Collagen fibre belongs to point group 3, which has a three-fold rotational axis (FIG. 3, b [19]) as its single element of symmetry [20] and thus it should be pyroelectric. Lang [21] proved that bone and tendon (predominantly made of collagen fibres with no apatite) both showed pyroelectricity and belonged to a hexagonal polar class with cylindrical symmetry (A_6 or C_6) as below:

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & d_{14} & d_{15} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & d_{15} - d_{14} & 0 & 0 \\ d_{31} & d_{31} & d_{33} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \quad (\text{Eq. 3}).$$

This matrix is appropriate for a material with a linear texture and spontaneous polarisation along that axis, as was approximately the case for tendon and, to a lesser degree for

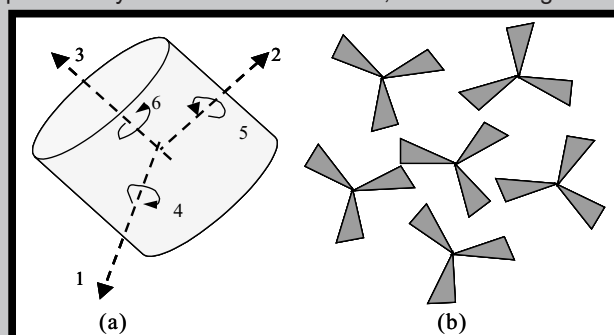


FIG. 3. Coordinate system for matrix notations (a) and texture group A_6 consisting of subunits (ref. 19) having point group symmetry 3 (b).

bone. Considerable effort was invested to prove this symmetry experimentally, but instead of only 4 independent piezoelectric coefficients as suggested in Eq. 3, finite values were measured for all the 18 piezoelectric coefficients in the matrix shown in Eq. 2. A slight misorientation of the collagen fibre from the fibre axis was held responsible to such lowering of symmetry, with the belief that bone piezoelectricity resulted from its collagenous matrix only [22]. Recent results on bone morphology suggests a more random orientation than that was usually thought and a biaxial orientation of bone apatite.

The proposition that bone piezoelectricity originates from collagen fibre found experimental evidence when Marino and Becker [6] measured piezoelectricity in demineralised bone, but could not find piezoelectricity in de-collagenated bone. However, piezoelectricity could still be found in bones that have been boiled for 2 hours, boiled and dried at 120°C (collagen denatures at $\sim 60^\circ\text{C}$) for 5 hours, freshly excised bones and bones that have been just dried [2, 23]. These treatments should effect the mechanical properties of organic materials and consequently, piezoelectricity should have been substantially compromised if collagen were solely responsible for bone piezoelectricity. Interestingly, even after using practically similar method to that as used by Marino and Becker [6] for obtaining de-collagenation, bone apatite was found piezoelectric in dynamic measurements [7, 24].

The effect of hydration, however, showed considerable effect on collagen as practically no piezoelectricity was found in tendon at 100% relative humidity. It has been suggested that the bound water in the material may change the symmetry to the point where no piezoelectricity can be observed [25, 26]. To the contrary, wet bone exhibited higher piezoelectric coefficients and some of the coefficients (such as the d_{31} coefficients) were over 50 times higher than those of dry bone [26].

The nature of electricity in bone is a steady-state potential measured as dc-potentials on the surface of living tissue and therefore relates to mechanically induced charge separation (i.e. piezoelectric polarisation) or to a concentration gradient between cations and anions at a surface giving

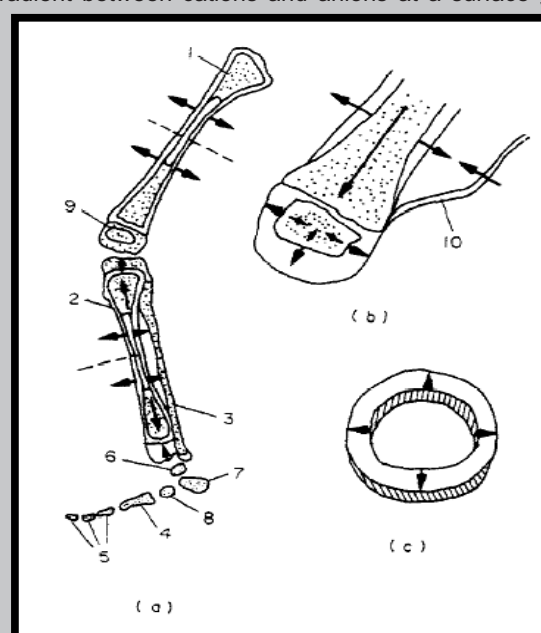


FIG. 4. Electric polarisation pattern (refs. 27 and 29) in the lower extremity of an infant (a), distal femur head (b) and a compact ring cut from the femur diaphysis that shows the radial direction of polarisation (c).

rise to a surface potential called zeta (ζ -) potential [27]. Under an electric field across the bone/body fluid interface, electrokinetic phenomenon (streaming potential) results when one phase moves with respect to the other. Recent theories [28,29] suggest that, when considered in non-classical sense, both piezoelectric polarisation and electrokinetic potential can be responsible for the electromechanical response of bone. No role for apatite was however suggested.

Physiological significance

Many authors have reported a correlation between bone piezoelectricity and its physiological significance [1, 3, 4, 9, 11, 14, 15, 27, 30]. As bone is pyroelectric, it has permanent dipoles. Atehenstaedt [31] has demonstrated electric polarisation pattern in the lower extremity of an infant (FIG.4) and explained the role of polarisation in ossification process. When a human reaches a certain age, radial polarisation disappears but longitudinal polarisation remains. So, if one creates an artificial radial polarisation vector in an area in the proximity of bone, then bone growth and regeneration can be induced locally in the radial direction [30,31], thus theorising experimentally observed electrical stimulation of osteogenesis. Based on piezoelectric polarisation in shear, Guzelsu calculated that, in wet bone, time required for deposition of an apatite layer having the same thickness (~10mm) as that of an osteon was about 12 days [30]. Bone can adjust its densities and orientations according to their functions. This response of bone to its functionality is known to occur in accordance with Wolff's law. In bone remodelling, this works as a feedback mechanism. While polarisation (piezoelectric or electrokinetic) in bone has been considered as responsible for such feedback mechanism, no quantitative insight is available for the ossification process under streaming potential.

To some extent, bone remodelling is a continuous process. A constant source of charge generation is required to sustain the process. Both piezoelectric and electrokinetic phenomena qualify as being the source in vivo. Whether they are competing or completing phenomenon is a matter of debate. However, it is interesting to note that in bone piezoelectric polarisation (~1.89 mCm⁻²) exceeds electret polarisation (~0.1 mCm⁻²). In contrast, electret polarisation in collagen (~1 mCm⁻²) is almost two orders higher than its piezoelectric polarisation. It is therefore reasonable to assume that collagen piezoelectricity on its own should not exhibit osteogenesis capability. Indeed, decalcified bone (essentially full of collagen) had failed to cause bone growth despite that its chemical and piezoelectric property was unchanged [27]. To compare, the maximum electret polarisation in pure hydroxyapatite has been reported is ~150 mCm⁻² [32], which is less than a quarter of what has been predicted theoretically for piezoelectric hydroxyapatite [33]. Apatite in bone is a carbonated form of hydroxyapatite, which as a single crystal, may or may not be piezoelectric, nevertheless, as has been argued by Shamos and Lavine [5], the ordered assemblage of small hydroxyapatite crystals within the bone structure may show this property. In other words this will mean that, in addition to providing mechanical stiffness to compact bone and working as a Ca-storage bank, there is also a physiological role for bone apatite.

Conclusions

Key experimental and theoretical works performed on bone piezoelectricity over the last five decades were critically reviewed here. It has been found that, despite numerous efforts, the origin of bone piezoelectricity is not well

understood. The physiological significance of polarisation in bone was well studied but there are controversies as related to what causes this polarisation in vivo. Most of the studies reviewed here considered collagen fibre as the origin of bone piezoelectricity and its physiological significance. A quantitative insight into the polarisation in bone, however, puts question to such assumption. Finally the study suggested that, bone apatite, similar to collagen can be piezoelectric too. Whether this is the case or not will remain a matter of further research.

Reference

- [1] Yasuda, I., Noguchi, K., and Sata, T., J. Bone Joint Surg., 1955. 37A: p. 1292-1293.
- [2] Fukada, E.a.Y., I., J. Phys. Soc. Japan, 1957. 12: p. 1158-1162.
- [3] Bassett, C.A.L.and.Becker, R.O., Science, 1962. 137: p. 1063-1064.
- [4] Becker, R.O., Bassett, C.A.L. and Bachman, C.H., in H.M. Frost, Editor. 1964, Little Brown and Co. p. 209-232.
- [5] Shamos, M.H.and.Lavine, L.S., Clinical Orthopaedics, 1964. 35: p. 177-188.
- [6] Marino, A.A. and Becker R.O., Calc. Tiss. Res., 1971. 8: p. 177-180.
- [7] Singh, S.and.Ranu, H. S., Biomaterials, 1986. 7: p. 432-437.
- [8] Korostoff, E., J. Biomechanics, 1977. 10: p. 41-44.
- [9] Marino, A.A.and.Becker R.O., Nature, 1970. 228: p. 78.
- [10] Williams, W.S. in G.W. Taylor et al. (ed.) Piezoelectricity, 1984, New York, Gordon and Breach Sc. Publ.
- [11] Marino, A.A., 1981.
- [12] Behari, J. Prog. Biophys. Molec. Biol., 1991, 56, 1-41.
- [13] Glvesic, A., J. Biomechanics, 1973, 6, 187
- [14] Guzelsu, N. and.Demiray, H., Int. J. Engg. Sci, 1979. 17: p. 813-851.
- [15] Williams, G. W.et. al., Editor. 1985, Gordon and Breach Science Publishers: New York. p. 213-234.
- [16] Ham, A.W., Histology. 6 ed. 1969, Philadelphia: Lippincott. 427.
- [17] Rosen, V.B., Hobbsa, W. and Spector, M., Biomaterials, 2002. 23: p. 921-928.
- [18] Ikeda, T., Fundamentals of Piezoelectricity. 1990, Oxford: Oxford University Press.
- [19] Lang, S.B., in Modern Bioelectricity, A.A. Marino, Editor. 1988, Marcel Dekker Inc.: New York. p. 247.
- [20] Ramachandran, G.N.and Kartha, G., Nature, 1954. 174: p. 269-270.
- [21] Lang, S.B., Nature, 1966. 212: p. 704-705.
- [22] Gundjian, A.A.and Chen, H.L., IEEE Trans. Biomed. Engg., 1974. 21: p. 177-182.
- [23] Aschero, G.et al., J. Biomechanics, 1996. 9: p. 1169-1174.
- [24] Singh, S.a.B., J., J. Biol. Phys., 1984. 12: p. 1-8.
- [25] Anderson, J.C.and.Eriksson, C., Nature, 1968. 218: p. 166.
- [26] Anderson, J.C.and.Eriksson, C., Nature, 1970. 227: p. 491.
- [27] Wai-hong, Y., Bull. HKMA, 1982. 34: p. 137-167.
- [28] Hastings, G.and.Mahmud, F., J. Biomed. Engg., 1991. 10: p. 515.
- [29] Uklejewski, R., J. Biomechanics, 1994. 27: p. 991-992.
- [30] Guzelsu, N., J. Biomechanics, 1978. 11: p. 257-267.
- [31] Atehenstaedt, H., Z. Anat. entw. Gesch, 1970. 131: p. 21-30.
- [32] Nakamura, S., Takeda H. and Yamashita K., J. Appl. Phys., 2001. 89: p. 5386-5392.
- [33] Tofail, S. A. M., Haverty, D.P., Stanton K.T. and McMonagle, J.B., Structural order and dielectric behaviour of hydroxyapatite, Ferroelectrics, 319, 2005, 1-7 and Haverty, D.P., Tofail, S. A. M., Stanton K.T. and McMonagle, J.B., The structure and stability of hydroxyapatite: Density functional calculation and Rietveld analysis, Phys. Rev. B, 71, 2005, 094103.



AKADEMIA GÓRNICZO - HUTNICZA

im. Stanisława Staszica w Krakowie

WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI

KATEDRA BIOMATERIAŁÓW

STUDIUM PODYPŁOMOWE

Biomateriały-materiały dla medycyny

Kierownik Studium: dr hab. inż. Marta Błażewicz



Studia obejmują podstawowe zagadnienia z dziedziny inżynierii biomateriałów

Czas trwania: 1 semestr obejmujący 140 godzin dydaktycznych (dwa weekendowe zjazdy w ciągu miesiąca)

Główne tematy:

1. Charakterystyka tworzyw implantacyjnych (metale, polimery, ceramika, tworzywa kompozytowe)
2. Zasady projektowania biomateriałów
3. Implanty do sterowanej regeneracji tkanek
4. Metody badań biogodności, przegląd metod in vitro, metody in vivo
5. Degradacja sztucznych tworzyw w żywym organizmie - metody badań
6. Inżynieria tkankowa
7. Regulacje prawne, standardy europejskie, ocena ryzyka

Charakterystyka studium:

Zajęcia obejmujące; wykłady i seminaria, dotyczyć będą kluczowych zagadnień z dziedziny inżynierii biomateriałów. Program studiów obejmować będzie charakterystykę tworzyw wykorzystywanych w medycynie; metali ich stopów, polimerów, ceramiki i oraz węgla syntetycznego i kompozytów. Omówione zostaną przykłady zastosowań tworzyw syntetycznych w różnych dziedzinach medycyny a mianowicie ortopedii, chirurgii kostnej, laryngologii, kardiologii, okulistyce i stomatologii i innych. Przedstawione zostaną metody projektowania i wytwarzania materiałów spełniających wymagania stawiane przez medycynę. Słuchaczom studium zaprezentowane zostaną metody fizykochemiczne stosowane, zarówno do charakterystyki materiału jak i przebiegu jego degradacji (w sztucznym i naturalnym środowisku biologicznym) oraz metody biologiczne do analizy zjawisk zachodzących na powierzchni tworzyw implantacyjnych w kontakcie z żywą komórką i tkanką. Na zajęciach prezentowane będą (w oparciu o konkretne przykłady) metody; FTIR, SEM, mikroskopii optycznej i mikroskopii AFM oraz badania mechaniczne z uwzględnieniem badań parametrów mechanicznych naturalnych tkanek oraz metody analizy fizycznych parametrów powierzchni (energia powierzchniowa, twardość, chropowatość).

Wykłady dotyczyć będą badania biogodności w warunkach in vitro i in vivo, omówienia normy ISO 10993 (Biologiczna ocena wyrobów medycznych) oraz regulacji prawnych i aspektów etycznych związanych z badaniami na zwierzętach. Dodatkowo omówione zostaną sposoby organizacji, nadzoru i monitorowania badań klinicznych.

Słuchacze studium zapoznani zostaną z najnowszymi osiągnięciami inżynierii tkankowej, metodami wytwarzania podłoży tkankowych i konstrukcją bioreaktorów.

Kandydaci powinni mieć wykształcenie wyższe: medyczne, przyrodnicze lub techniczne

Ostateczny termin zgłoszeń 05 luty 2006.

Koszt studium 1 650 PLN

Szczegółowe informacje i zgłoszenia: pn. - pt. godz. 10.00 - 14.00,

Katedra Biomateriałów, Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH.

Al. Mickiewicza 30, 30 059 Kraków, paw. A3 II piętro pok. 228a.

Nr telefonu: (12) 617 47 38

e-mail: mblazew@agh.edu.pl

Wskazówki dla autorów

Prace do opublikowania w czasopiśmie "Inżynieria Biomateriałów" będą przyjmowane wyłącznie z tłumaczeniem na język angielski.

Prosimy je nadsyłać na dyskietkach wyłącznie w formacie Word 6.x (lub wyższy) wraz z jednym egzemplarzem kontrolnego wydruku i kompletem rysunków i zdjęć.

Możliwe jest również dołączanie ilustracji w różnych formatach grafiki typu .eps, .jpg, .tif, .cdr, .cpt, .gif.

Rozmiar artykułu:

- przeglądowego i pracy oryginalnej - do 10 stron standardowego maszynopisu,
 - komunikatu - do 5 stron,
 - noty technicznej - do 3 stron
- Obowiązuje układ jednostek SI.
 Rysunki, tabele i równania powinny być kolejno ponumerowane.

Struktura artykułu:

- streszczenie (do 200 słów),
- słowa kluczowe (3-10 słów),
- wprowadzenie,
- materiał i metodyka,
- wyniki,
- dyskusja,
- wnioski,
- piśmiennictwo (wg systemu Harvard).

Odnośniki literaturowe w tekście należy podawać jako kolejne liczby arabskie w nawiasach kwadratowych.

Piśmiennictwo (zawierające nazwiska autorów i skróty ich imion, tytuł artykułu, tytuł czasopisma, tom, rok w na wiasach okrągłych i strony) powinno być zamieszczone na końcu artykułu. Skróków tytułów czasopism należy unikać bądź podawać zgodnie z Chemical Abstract. Cytując książki należy podawać numery odpowiednich rozdziałów.

Nie przewiduje się wypłacania honorariów autorskich.

Prace należy nadsyłać na adres:

Redakcja "Inżynieria Biomateriałów"
 Akademia Górniczo - Hutnicza
 Katedra Biomateriałów
 30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3
 fax. (48-12) 617-33-71
 tel. (48-12) 617-22-39
 e-mail: apowroz@uci.agh.edu.pl

Warunki prenumeraty

Wydawnictwo Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów w Krakowie przyjmuje zamówienia na prenumeratę, która może obejmować dowolny okres, w którym wydawane są kolejne zeszyty. Zamawiający otrzyma zaprenumerowane zeszyty poczynawszy od daty dokonania wpłaty. Zamówienia wstecz będą realizowane w miarę posiadanych zapasów.

Realizacja zamówienia

Warunkiem realizacji zamówienia jest otrzymanie z banku potwierdzenia dokonania wpłaty przez prenumeratora.

Konto

Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów
 30-059 Kraków, al. Mickiewicza 30/A-3
 Bank Śląski S.A. O/Kraków,
 nr rachunku 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

Należy podać swój adres, tytuł czasopisma, okres prenumeraty i liczbę zamawianych egzemplarzy.

Cena nr 47-53: 150.00 PLN

Instructions to authors

Contributions in English language version should be submitted to:

Editorial Office

"Engineering of Biomaterials"

AGH University of Science and Technology

Department of Biomaterials,

Al. Mickiewicza 30/A-3, 30-059 Kraków, Poland

fax. (48-12) 617-33-71, tel. (48-12) 617-22-39

e-mail: apowroz@uci.agh.edu.pl

Texts should be delivered on a 3.5-inch diskette, accompanied by a printout (with a double spacing) including drawings, photographs, tables etc. Recommended is IBM-compatible MS format, e.g. Word 6.x (or higher). Illustrations can be enclosed on diskettes in the formats: .eps, .jpg, .tif, .cdr, .cpt, .gif.

Advised paper length is:

- review papers and accounts of original unpublished research - up to 10 pages (standard manuscript pages);
- short communications - up to 5 pages;
- technical notes - up to 3 pages.

SI units should be used in the text.

Figures, Tables and Equations should be numbered in corresponding consecutive series of the Arabic numbers.

Layout of the paper should be the following:

- Abstract (up to 200 words)
- Key words (3-10 words)
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion
- Conclusions
- References

References should be made in the text by using consecutive Arabic numbers in brackets. Full references (including author's surname and abbreviated names, title of the paper, title of the journal, volume, year in parenthesis and pages) should be given in a list at the end of the paper. Abbreviations of journal titles should be avoided or used in accordance with those listed in Chemical Abstracts. Whenever a book is cited, the number of the relevant chapter should be given.

The journal makes no page charges.

Subscription terms

Subscription orders should be addressed to the Polish Society for Biomaterials in Kraków.

The ordered issues will be delivered consecutively starting from the date of payment, acknowledged by the bank.

Earlier issues will be supplied if available.

Subscription rates:

Cost of number 47-53: 150.00 PLN

Payment should be made to:

Polish Society for Biomaterials,

Al. Mickiewicza 30/A-3,

30-059 Kraków, Poland

Bank Śląski S.A. O/Kraków,

account no. 63 1050 1445 1000 0012 0085 6001

It is requested to quote the subscriber's name, title of the journal, desired subscription period and number of the ordered copies.